

**METHODEN ZUR BELADUNG VON
LIPOPROTEINEN MIT β -CAROTIN**

Stefan J. Geldner

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

METHODEN ZUR BELADUNG VON LIPOPROTEINEN MIT β -CAROTIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Stefan J. Geldner

aus

Schönbrunn / Staffelstein

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: _____ Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: _____ Priv.Do. Dr. Dr.habil. J. Bauer

Tag der Promotion: _____ 26. Februar 1988

Meinen Eltern und Geschwistern

INHALTSÜBERSICHT

1	EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Carotinoide	2
2.1.1	Resorption und Transport	3
2.1.2	Einfluß von β -Carotin auf die Fruchtbarkeit	4
2.1.3	β -Carotin und Tumoren	6
2.2	Lipoproteine	10
2.2.1	Struktur der Lipoproteine	13
2.2.2	Stoffwechsel der Lipoproteine	16
2.2.2.1	Bedeutung und Vorkommen der LDL-Rezeptoren für den Stoffwechsel in der Zelle	17
2.2.3	Markierung von Lipoproteinen mit Lipiden	19
2.2.3.1	Rekombinationsmethoden nach Extraktion der Lipide mit organischen Lösungsmitteln	20
2.2.3.2	Rekombinationsmethoden nach Extraktion der Lipide mit Detergentien	22
2.2.3.3	Inkubationsmethoden von Lipoproteinen und Plasma ohne vorherige Extraktion	23

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3	MATERIAL und METHODEN	24
3.1	Tiere	24
3.2	Probennahme und Probenkonservierung	24

3.3	Auftrennung der Serumlipoproteine	25
3.3.1	Ausfällung der VLDL/LDL-Fraktion aus dem Serum	25
3.3.2	Abtrennung der LDL- von der VLDL-Fraktion durch Ultrazentrifugation	25
3.3.3	Darstellung der HDL-Fraktion des Serums	26
3.4	Analyse der zu untersuchenden Parameter in Lipoproteinen und Serum	27
3.4.1	Bestimmung von β -Carotin	27
3.4.2	Bestimmung von Protein	28
3.4.3	Bestimmung von Cholesterin und Triglyceriden	28
3.4.4	Messung der Radioaktivität von 14 -C-markiertem β -Carotin	29
3.5	Nachweis der rekombinierten β -Lipoproteine sowie der markierten Lipoproteinfraktionen des Serums	29
3.5.1	Ausfällung mit Dextransulfat	29
3.5.2	Analytische Ultrazentrifugation	30
3.5.3	Elektrophorese	30
3.5.4	Zellkultur	32
3.5.4.1	Züchtung der Zellkultur	32
3.5.4.2	Herstellung von lipoproteinfreiem Serum	33
3.5.4.3	Herstellung der Inkubationsmedien	34
3.5.4.4	Inkubation der Zellen	34

4	ERGEBNISSE	35
4.1	Rekombination von β -Lipoproteinen mit β -Carotin	35
4.1.1	Methodik	35
4.1.2	Versuchsanordnung und Ergebnisse	37
4.1.2.1	Versuch I: Die Rekombination von gelösten β -Lipoproteinen mit β -Carotin ohne Anwendung von Ultraschall	37
4.1.2.2	Versuch II: Die Rekombination von gelösten β -Lipoproteinen mit β -Carotin unter Einwirkung von Ultraschall	40
4.1.2.3	Versuch III: Die Rekombination von ausgefallenen β -Lipoproteinen mit β -Carotin unter Einwirkung von Ultraschall	42
4.1.2.4	Versuch IV: Modifikationen der Rekombinationsphase unter Einwirkung von Ultraschall	44
4.2	Inkubation von Rinderserum mit β -Carotin	49
4.2.1	Inkubation von Serum mit ungelöstem β -Carotin (Methode)	49
4.2.1.1	Versuch V: Transfer von ungelöstem β -Carotin in Serum und Lipoproteine	49
4.2.2	Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch gelöstem β -Carotin (Methode)	51
4.2.2.1	Versuch VI: Verteilung des äthanolisch gelösten β -Carotins auf die Lipoproteine und Verhalten von β -Carotin und Cholesterin während der Inkubation	52
4.2.2.2	Versuch VII: Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch gelöstem β -Carotin unter spezieller Betrachtung der VLDL-Fraktion	59

4.2.2.3	Versuch VIII: Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch ge- löstem, radioaktivem β -Carotin und Einsatz an Zellkulturen	61
5	DISKUSSION	63
5.1	Methodik	63
5.1.1	Rekombination von β -Lipoproteinen mit β -Carotin	63
5.1.2	Inkubation von Rinderserum mit β -Carotin	67
5.2	Bedeutung der β -Carotin beladenen Lipo- proteine für den Einsatz in Zellkulturen und in-vivo	73
5.3	Schlußfolgerung	75
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
	SUMMARY	77
7	LITERATURVERZEICHNIS	78

1 EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Dem β -Carotin fallen neben seiner Rolle als Provitamin A auch spezifisch eigenständige Funktionen zu. Während LOTT-HAMMER (1978) einen Einfluß auf die Fruchtbarkeit bei Rindern herausstellt, zeigen PETO et al. (1981) eine negative Korrelation zwischen der β -Carotin-Versorgung und dem Auftreten gewisser Tumorarten beim Menschen.

Die lokale Wirkung kann nur durch eine ausreichende Versorgung der peripheren Organe mit β -Carotin gewährleistet werden. Dies setzt voraus, daß β -Carotin, an Lipoproteine gebunden, zu den Zellen des Zielgewebes gelangt. Eine Aufnahme über Lipoproteinrezeptoren, wie dies bei anderen lipophilen Substanzen bekannt ist, ist sehr wahrscheinlich.

Bisher stand kein *in-vitro* Versuchssystem für β -Carotin zur Verfügung, das den biologischen Verhältnissen nahekam.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit Hilfe verschiedener Methoden exogenes β -Carotin an Lipoproteine zu binden und die Effizienz dieser Methoden zu beurteilen. Außerdem sollten die markierten Lipoproteine hinsichtlich ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften mit nativen Lipoproteinen verglichen werden.

Als Versuchsmodell schien "low density lipoprotein" besonders interessant, da bei einer Vielzahl von Geweben entsprechende Rezeptoren nachgewiesen wurden (KOVANEN et al., 1979a,b). Diese Lipoproteine spielen außerdem eine wichtige Rolle bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen, sowie bei der Behandlung von Tumoren mit cytotoxischen Substanzen (BROWN et al., 1980 und LUNDBERG, 1987).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Carotinoide

Carotinoide sind ubiquitär vorkommende Polyprenverbindungen, die hauptsächlich in Pflanzen, Pilzen und Bakterien anzutreffen sind. Ihre weite Verbreitung erklärt sich dadurch, daß sie den Pflanzen als Hauptschutz gegen toxische Sauerstoffradikale, die bei der Interaktion von Licht und Chlorophyll entstehen, dienen. Auch als farbgebende Pigmente in Blüten und Früchten sind sie von Bedeutung. Man schätzt die Menge der jährlich von der Natur produzierten Carotinoidpigmente auf über 100 Millionen Tonnen.

Bei den Carotinoiden können zwei Gruppen differenziert werden: Rot bis orange gefärbte, aus Kohlen- und Wasserstoff bestehende Carotine, und gelbe bis braune Xanthophylle, die zusätzlich Sauerstoff enthalten (KRINSKY & DENEKE, 1982).

Säugetiere sind nicht zur de novo-Synthese von Carotinoiden befähigt, können jedoch bestimmte Carotinoide in Vitamin A umwandeln.

Bei den Säugern werden, je nach der Speicherfähigkeit für Carotinoide, zwei Hauptgruppen unterschieden. Sogenannte "white fat animals", denen Schwein, Schaf, Ziege, Hund, Katze und Ratte zugerechnet werden, können Carotinoide meist nur in Spuren resorbieren oder wandeln diese in der Darmwand zu Vitamin A um. Denen stehen die "yellow fat animals" gegenüber, die Carotinoide im Gewebe speichern können. Der

Mensch akkumuliert sowohl Carotine wie Xanthophylle, während bei Pferd und Rind vornehmlich Carotine zu finden sind.

Im folgenden findet nur β -Carotin Berücksichtigung.

2.1.1 Resorption und Transport

Das mit der Nahrung aufgenommene β -Carotin wird im Darm sowohl über spezifische Rezeptoren wie durch Diffusion resorbiert (GANGULY et al., 1959; HOLLANDER and RUBLE, 1978).

Nach der Resorption wird β -Carotin an Chylomikronen gebunden und über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf eingeschleust. Im Blut erfolgt der Transport durch Lipoproteine. Entsprechend dem Anteil der einzelnen Lipoprotein-Fractionen an den gesamten Lipoproteinen ist beim laktierenden Rind folgende Verteilung gegeben (SCHWEIGERT et al., 1987):

VLDL (Very Low Density Lipoprotein):	0,3 %
LDL (Low Density Lipoprotein):	12 %
HDL (High Density Lipoprotein):	83 %

Die Verteilung erwies sich unabhängig von der β -Carotin-Konzentration im Blut. Jedoch ist während der Periode des Trockenstehens ein Anstieg des Anteils von VLDL bzw. LDL am Transport von β -Carotin auf ca. 1 % bzw. 15 % zu verzeichnen. Ebenso ist beim Saugkalb der Anteil von VLDL und LDL mit zusammen 27 % signifikant erhöht (SCHWEIGERT et al., 1987).

2.1.2 Einfluß von β -Carotin auf die Fruchtbarkeit

Die zunehmende Bedeutung konservierter Futtermittel wie Heu und Silage und der Rückgang der Weidehaltung führten zu einer mangelhaften Versorgung der Rinder mit β -Carotin. Die gleichzeitig beobachteten Fruchtbarkeitsstörungen gaben zu der Hypothese Anlaß, daß diese auf einen β -Carotin-Mangel im Futter zurückzuführen seien. In Depletionsversuchen an Färsen und Kühen wurde die eigenständige, Vitamin A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität bestätigt. Folgende Störungen traten nach LOTTHAMMER (1978) auf:

- Schwächer ausgeprägte Brunstsymptome und eine verlängerte Brunstdauer
- Verzögerte Ovulation bei Kühen und Färsen mit Verschlechterung des Besamungsindex von 1,42 bei der Kontrollgruppe auf 2,00 bei der Versuchsgruppe
- Follikel- und Corpus-luteum-Zysten
- Embryonale Entwicklungsstörungen bei Färsen, sowie embryonaler Fruchttod und Frühaborte bei Kühen
- Langsamere Uterusinvolutions und verzögerte Ovarfunktion nach der Geburt

Anhand weiterer Veröffentlichungen konnten diese Ergebnisse zum Teil bestätigt werden. ZUCKER et al. (1980) fanden bei Untersuchungen an Fleckviehkühen vermehrt Follikelzysten sowie eine Verlängerung des Intervalls zwischen dem LH-Peak und der Ovulation. Die Dauer der Brunst und der Besamerfolg blieben allerdings unbeeinflusst. BONSEMBIANTE et al. (1983 a,b) beschrieben unregelmäßige Zyklen, schwächere Brunstsymptome und eine um 50 % höhere Zahl der Besamungen

pro Trächtigkeit. Jedoch zeigte sich kein Einfluß auf die embryonale Entwicklung und die Aborthäufigkeit. Zudem wurden gehäuft Endometritiden und Nachgeburtsverhalten festgestellt (MEINECKE et al., 1986; INABA et al., 1986).

Diese Zyklus- und Fertilitätsstörungen können durch erneute Zufuhr von β -Carotin behoben werden und sind damit reversibel (ARBEITER et al., 1983).

Manche Autoren sprechen dem β -Carotin jegliche Wirkung auf das Fortpflanzungsgeschehen ab. Durch die β -Carotin-Zulage ließen sich Ovarzysten, Konzeptionsrate, Uterusinvolution und die Zeitspanne zwischen Geburt und erstem Östrus nicht beeinflussen (MARCEK et al., 1985; AKORDOR et al., 1986).

FOLMAN et al. (1979) konnten die Ergebnisse hinsichtlich der verlängerten Östrusdauer und der Verlängerung des Zeitraumes zwischen dem LH-Peak und der Ovulation ebenfalls nicht bestätigen. In neueren Versuchen stellten sie jedoch fest, daß bei Plasmaspiegeln unter $50 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ durch die Zulage von β -Carotin die Fertilität signifikant verbessert werden kann (FOLMAN et al., 1983).

Die bisherigen Ausführungen zeigen die möglichen Auswirkungen eines β -Carotin-Mangels auf das Fruchtbarkeitsgeschehen. Untersuchungen über die Wirkungsprinzipien von β -Carotin stehen jedoch am Anfang. Erste Ergebnisse weisen auf ein carotinspaltendes Enzym im Corpus luteum und damit auf eine Provitamin A-Funktion des β -Carotins hin (SKLAN, 1983).

Untersuchungen der Follikelflüssigkeit auf β -Carotin und Vitamin A ergaben, daß die β -Carotin-Konzentration von der Follikelgröße unabhängig ist und mit 36 % der Serumkonzentration Ergebnissen von CHEW et al. (1984) entspricht. Vitamin A dagegen weist eine deutliche Abhängigkeit von der Fol-

likelgröße auf mit höchsten Konzentrationen in den großen Follikeln (SCHWEIGERT et al., 1986). Neueste Untersuchungen zeigen, daß die Änderungen der Vitamin A-Konzentration in der Follikelflüssigkeit eine deutliche Übereinstimmung mit der Konzentration an 17 β -Östradiol aufweisen und damit von der Follikelqualität abhängig sind (SCHWEIGERT & ZUCKER, 1988a). Eine lokale Umwandlung von β -Carotin in Vitamin A in follikulären Strukturen wird deshalb von den Autoren nicht ausgeschlossen. Die diskutierte Carotinase würde eine genaue Steuerung der Vitamin A-Konzentration im ovulierenden Follikel für die Reifung und Differenzierung der Follikelstrukturen ermöglichen.

2.1.3 β -Carotin und Tumoren

Das vermehrte Auftreten von Tumoren bei Menschen und Tieren rückt nicht nur die Frage nach deren Ätiologie, sondern auch nach den Präventiv- und Therapiemöglichkeiten in den Mittelpunkt. Da die chemopräventiven Eigenschaften der Vitamin A-Analoga schon seit langem bekannt sind, gilt in jüngerer Zeit dem β -Carotin, einem Vitamin A-Vorläufer, verstärktes Interesse.

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, daß beim Menschen durch den geringeren Verzehr β -Carotin-haltiger Gemüsesorten das Risiko für Lungenkrebs und Brusttumoren zunimmt (SHEKELLE et al., 1981; WALD et al., 1984). Die β -Carotin-Versorgung wurde bei einem Teil der Probanden zwar nur über ihre Verzehrsgewohnheiten geschätzt, doch belegen auch eine Vielzahl von Tier- und in-vitro-Versuchen die antikanzerogene Wirkung.

Bei Mäusen, die mit UV-Licht bestrahlt werden, kann sowohl das Auftreten squamöser Zellkarzinome in der Haut wie auch

die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren herabgesetzt werden (EPSTEIN, 1977). Die TD 50, d.h. die Zeit, in der 50 % der Tiere erkranken, bleibt aber selbst bei Zufütterung von 3 % β -Carotin unbeeinflusst (MATHEWS-ROTH & KRINSKY, 1984).

Zusätzlich aufgetragene mutagene Agentien, die neben dem UV-Licht Irritationen hervorrufen, scheinen die Effektivität von β -Carotin nicht zu berühren. Es reduziert die Anzahl und verlängert die Inkubationszeit von Haut- und Speicheldrüsentumoren, die durch Benzpyren, Dimethylbenzanthracen (DMBA)/Krotonol oder DMBA/UV-B induziert werden (SANTAMARIA et al., 1980; MATHEWS-ROTH, 1982 und ALAM & ALAM, 1983).

Bei Untersuchungen an isolierten Milchdrüsen von Mäusen konnten SOM et al. (1984) die Wirksamkeit von β -Carotin *in vitro* nachweisen. β -Carotin wurde bei diesem Modell in Hexan zugegeben. Die Zahl der DMBA-induzierten Tumoren verringert sich bei gleichzeitiger Gabe von β -Carotin um 68 %.

Zudem sind im Falle einer Ganzkörperexposition mit Gammastrahlen positive Auswirkungen von β -Carotin bekannt (SEIFTER et al., 1984). Die Überlebenszeit der Mäuse verlängert sich unter Einfluß von β -Carotin, und die LD 50/30, d.h. die Dosis, bei der 50 % der Tiere in 30 Tagen sterben, erhöht sich um 135 rad. Auch können Leuko- und Thrombozytopenien positiv beeinflusst werden (SHEN et al., 1983).

β -Carotin ist neben der unterstützenden Wirkung bei der lokalen Behandlung von Tumoren mit Röntgenstrahlen auch in der Lage, das Wiederaufleben behandelter Tumoren über Monate zu verhindern (SEIFTER et al., 1983).

Untersuchungen belegen, daß β -Carotin zudem auf Tumoren, die durch virale Inokulation oder durch Übertragung von Tumorzellen ausgelöst werden, Einfluß hat. Die Zulage von 90 mg β -

Carotin/kg Futter reicht aus, um Frequenz und Wachstum Moloney-Sarkom-Virus- oder Adenokarzinomzell-induzierter Tumoren zu verringern, sowie Latenzzeit und Tumorrückbildung positiv zu beeinflussen (SEIFTER et al., 1982; RETTURA et al., 1982). Therapeutisch beachtenswert ist, daß die positive Wirkung auf die Tumorrückbildung auch dann vorhanden scheint, wenn die Supplementierung erst nach der Tumoraus- bildung erfolgt.

Nur wenige Autoren sprechen dem β -Carotin einen Einfluß im Krebsgeschehen ab. Die Untersuchungen beschränken sich vornehmlich auf Neoplasien im Gastrointestinaltrakt (MODAN et al., 1981; COLACCHIO & MEMOLI, 1986).

Bei der Tumorabwehr durch β -Carotin werden verschiedene Wirkmechanismen in Betracht gezogen (PETO et al., 1981): 1) Die Vitamin A ähnliche, aber eigenständige Wirkung von β -Carotin im Zielgewebe; 2) Der Schutz der Zelle unabhängig von Differenzierungsvorgängen, z.B. durch Abfangen von Radikalen; 3) Die Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A in der Zielzelle.

Eine gewisse, eigenständige Wirkung ist dem β -Carotin zuzu- sprechen, da sich UV-B- und DMBA- induzierte Tumoren in gleicher Weise sowohl durch β -Carotin wie durch andere Carotinoide (Xanthaxanthin, Phytoen), die nicht in Vitamin A umgewandelt werden können, beeinflussen lassen (MATHEWS- ROTH, 1982 und SOM et al., 1984).

Möglicherweise ist die Fähigkeit von β -Carotin, insbesondere Sauerstoffradikale abzufangen, der Grund für seine Wirksam- keit (PACKER et al., 1981). Diese können unter der Einwir- kung von Strahlen, aber auch bei anderen Gewebeerirritationen gebildet werden, und führen in einer Kettenreaktion zu neuen Radikalen und Zellmutationen. Desweiteren sind Carotinoid-

pigmente in der Lage, Lipidperoxidationen, z.B. an Liposomen, zu verhindern (KRINSKY & DENEKE, 1982). Die besondere Bedeutung als Antioxidans untermauern BURTON & INGOLD (1984), die β -Carotin bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 150 torr als sehr wirksam fanden. Bei hohen Druckverhältnissen dagegen zeigt β -Carotin autokatalytische und sogar prooxidative Effekte. Zudem wird dem β -Carotin ein Filtereffekt bei ultravioletter Strahlung zugeschrieben, da sich sein Absorptionsspektrum (400 bis 500 nm) in geringem Ausmaß mit UV-B, das in der Haut von Säugetieren die Bildung von Radikalen bewirken kann, überschneidet (EPSTEIN, 1977).

Ein weiterer, für die Tumorbewehr bedeutender Mechanismus ist der Einfluß von β -Carotin auf menschliches Interferon (RHODES, 1983). Demnach hebt β -Carotin nicht nur die Hemmung der Lymphoblastenzellteilung durch Interferon auf, sondern es fördert auch die Monozytenaktivierung durch Interferon. Vitamin A wirkt als Antagonist, so daß dem Verhältnis β -Carotin zu Vitamin A möglicherweise eine Steuerfunktion im Interferonsystem zukommt. Ein anderer immunologischer Effekt ist in der Stimulierung der Lymphopoese zu sehen, da dadurch das Metastasenrisiko vermindert werden kann (SEIFTER et al., 1982). Retinsäure, ein Produkt des Vitamin A-Stoffwechsels, zeigt bei in-vitro Untersuchungen einen stimulierenden Effekt auf Killerzellen (LOTAN, 1980). Eine verbesserte allgemeine Stoffwechsellaage im Organismus mit geringerer Straßenanfälligkeit, dokumentiert durch ein vermindertes Gewicht der Nebennieren, untermauern diese Feststellungen (SEIFTER et al., 1983).

MATHEWS-ROTH (1982) fand, daß durch Agentien- oder UV-B-ausgelöste Neoplasien der Haut nur mit β -Carotin, nicht aber mit Phytoen und Xanthaxanthin beeinflusst werden können. Sie führt dies auf die Provitamin A-Funktion von β -Carotin und die Anreicherung von Retinol in der Haut zurück. Die Fähig-

keiten von Retinol auf die Vorgänge der Zelldifferenzierung, als Radikalfänger und bei der Absorption von Strahlen sind hinreichend bekannt.

Werden tumortherapeutische Bestrahlungen unter der Schutzwirkung von β -Carotin durchgeführt, so bleibt der Bestahlungserfolg zwar unbeeinflusst, unerwünschte Bestrahlungseffekte werden aber verhindert (SEIFTER et al., 1984). Diese Tatsache ist bedeutungsvoll für eine mögliche Anwendung von β -Carotin in der Tumorthherapie. Während die vermehrte Aufnahme von Vitamin A zu akuten und chronischen Intoxikationen führen kann, ist die Aufnahme von β -Carotin selbst in sehr hohen Dosen mit keinen toxischen Nebenwirkungen verbunden (HEYWOOD et al., 1985).

2.2 Lipoproteine

Die meisten Lipide und Lipide werden im wässrigen Milieu des Blutes als Lipoproteine transportiert. Lipoproteine stellen Komplexe aus Lipiden und Trägerproteinen, auch Apoproteine genannt, dar. In Abhängigkeit von der Menge der gebundenen Lipide lassen sich die Lipoproteine in vier Dichteklassen einordnen:

- Chylomikronen
- Very Low Density Lipoproteine (VLDL)
- Low Density Lipoproteine (LDL)
- High Density Lipoproteine (HDL)

Nach neueren Untersuchungen darf die Existenz von Chylomikronen beim Rind als gesichert gelten, sie spielen aber mengenmäßig eine untergeordnete Rolle (FERRERI & ELBEIN, 1982). Die triglyceridreichen Partikel mit einem Durchmesser von 75 bis 300 nm können bei Milchkälbern jedoch bis zu 9 % der Lipoproteine ausmachen (BAUCHART & LEVIEUX, 1985).

Lipoproteine mit einer Dichte unter 1,006 g/ml werden von RAPHAEL et al. (1973a,b) als VLDL-Fraktion definiert. Obwohl sie mit 94 % neben den Chylomikronen den höchsten Lipidgehalt aufweisen, tragen sie je nach Laktationszustand nur bis zu 5 % zum Transport der Gesamtlipide bei (STEAD & WELCH, 1975).

Als LDL werden Lipoproteine mit einer Dichte von 1,006 bis 1,063 g/ml angesehen. Beim Menschen werden wegen der Isolierung sogenannter intermediärer Lipoproteine (IDL) zwei Unterklassen mit einer Dichte von 1,006 - 1,019 g/ml und 1,019 - 1,063 g/ml eingeführt (EISENBERG & LEVY, 1975). Der Proteinanteil von 20 % wird zum größten Teil von Apoprotein B eingenommen und ist für die β -Mobilität bei der Elektrophorese verantwortlich. Bis zu 9 % des Apoproteins bestehen aus Carbohydratketten mit Galaktose, Mannose, Glukosaminen und Sialinsäureresten. Das Apoprotein B (MG 25.000) ist als Ligand für die Bindung vom LDL an die Zellrezeptoren peripherer Gewebe von Bedeutung (GOLDSTEIN & BROWN, 1977). Da fast 60 % der Lipide aus freiem und verestertem Cholesterin bestehen (STORRY et al., 1980), spielt diese Fraktion eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel der Zellen.

Die HDL-Fraktion (Dichtebereich zwischen 1,063 g/ml und 1,210 g/ml) transportiert etwa 75 % der Gesamtlipide. Der

Tab. 1: Die Lipoproteine des Rindes - Vergleichsdaten nach RAPHAEL et al. (1973a,b), STEAD & WELCH (1975) und STORRY et al. (1980)

	VLDL	LDL	HDL
Dichte g/ml	1,006	1,006-1,063	1,063-1,213
Mobilität bei der Elektrophorese	prä- β	$\beta, (\alpha)$	α
Hauptapoproteine	B,C	B	A,C
Lipidanteil %	94	80	72
Verteilung in %			
Triglyceride	61	11	1
Phospholipide	18	29	40
Cholesterin	13	58	57
freie Fettsäuren	8	2	2
Anteil am Lipid-transport %	ca. 5	ca. 25	ca. 70

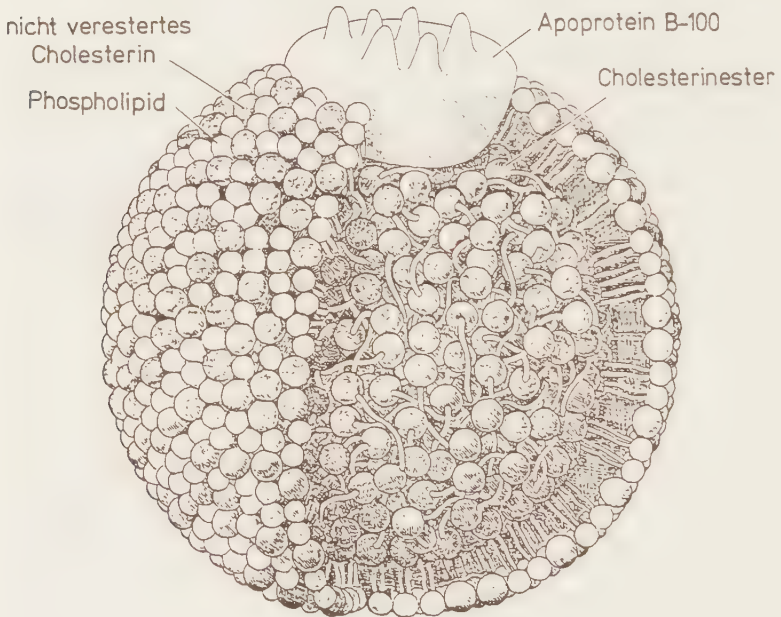
Lipidanteil mit 72 % enthält nur Spuren von Triglyceriden, aber eine sehr hohe Konzentration an Phospholipiden und Cholesterinestern (RAPHAEL et al., 1973b). Die Lipoproteine wandern im elektrischen Feld immer mit α -Mobilität. Das Apoprotein A I stellt 90 % des Gesamtproteins dar.

Im Blutserum treten Proteine auf, die neben den eigentlichen Lipoproteinen in der Lage sind, Lipide zu binden und zu transportieren. Dazu gehört ein Glykoprotein mit einer Dichte über 1,25 g/ml, das Cholesterinester von HDL auf LDL und VLDL transferieren kann und einer Sättigungskinetik unterliegt (PATTNAIK et al., 1978). Aufgrund elektrostatischer Kräfte können auch freie Fettsäuren reversibel an Albumin gebunden werden (FREDRICKSON & GORDON, 1958).

2.2.1 Struktur der Lipoproteine

Plasmalipoproteine sind im wesentlichen gleich aufgebaut. Es handelt sich um sphärisch strukturierte Moleküle, deren Oberfläche vorwiegend von Phospholipiden und unverestertem Cholesterin sowie Apoproteinen gebildet wird. Ihr Kern beherbergt die Neutralfette, hauptsächlich Cholesterinester und Triglyceride (BROWN & GOLDSTEIN, 1985). Die Verteilung der Lipide zwischen dem Kern und der Oberfläche des Lipoproteins hängt vom Verteilungskoeffizienten Lipid-Wasser ab. So finden sich Phospholipide und freies Cholesterin im Kern der Lipoproteine, ebenso wie umgekehrt Neutralfette am Aufbau der Oberfläche beteiligt sein können (SCHNEIDER et al., 1973; DECKELBAUM et al., 1977). Dadurch sind sie leichter auf andere Moleküle transferierbar oder können von Enzymen angegriffen werden.

Abb. 1: Aufbau eines LDL-Moleküls (nach BROWN & GOLDSTEIN, 1985)



Die Anordnung der Triglyceride und Cholesterinester ist von der Temperatur abhängig. Die bei niedrigen Temperaturen vorhandene, konzentrische Schichtung der Cholesterinester wird bei 45° C durch eine ungeordnete Verteilung ersetzt. Diese Temperaturabhängigkeit könnte Auswirkungen auf die Fluidität und Oberflächenstruktur des LDL-Moleküls haben und damit die Aufnahme in die Gewebezellen beeinflussen (DECKELBAUM et al., 1977).

Wassermoleküle sind wichtige Bestandteile des Lipoproteins, da sie Bindungen zwischen dem Protein- und dem Lipidanteil erleichtern (ONCLEY, et al., 1950). Den Wassergehalt der LDL-Fraktion beziffern sie auf 0,6 g/g Protein, die Entfernung führt zu irreversiblen Veränderungen.

Die Bindungsverhältnisse zwischen dem Apoprotein und den Phospholipiden sind für den Einbau der Neutralfette wichtig (SEGREST et al., 1974). Helikale Regionen des Apoproteins zeigen einen amphipathischen Aufbau. Der größere, apolare Anteil geht enge Bindungen mit den CH_2 -Gruppen der Fettsäuren des Phospholipids ein. Der polare Anteil mit den positiven Ladungen der Aminosäuren Arginin und Lysin und den negativen Ladungen von Asparagin- und Glutaminsäure ist den polaren Gruppen der Phospholipide und des umgebenden wässrigen Milieus gegenübergestellt. Dabei scheinen aber keine elektrostatischen Kräfte zwischen dem Apoprotein und den Phospholipiden zu bestehen. Möglicherweise sind die Ladungen der Aminosäuren bei der Synthese der Lipoproteine sowie für den Bindungsvorgang mit Phospholipiden von Bedeutung. Zudem halten sie das Apoprotein an der Oberfläche des Lipoproteinmoleküls, so daß es seine spezifischen Funktionen, z.B. als Ligand für Rezeptoren, wahrnehmen kann.

An welcher Stelle die Anlagerung und Bindung von β -Carotin erfolgt, ist unklar. Neben KRINSKY et al. (1958), die eine spezifische Form der Bindung vorschlagen, postulieren ASHES et al. (1984) eine unspezifische Einlagerung in den Lipidkern der Lipoproteine.

2.2.2 Stoffwechsel der Lipoproteine

Der nachfolgende Abschnitt stellt eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Stoffwechselschritte nach PUPPIONE (1978) und GOTTO et al. (1987) dar.

Die von den Leberzellen sezernierten VLDL-Partikel weisen an ihrer Oberfläche vornehmlich Apoprotein B, Cholesterin und Phospholipide auf. Um für die Lipoproteinlipase (LPL) angreifbar zu werden, muß Apoprotein C von HDL auf VLDL übertragen werden. Die Untereinheit Apo C II stellt einen Aktivator dieses Enzyms dar, das an der Endotheloberfläche von Kapillaren in der Milchdrüse, der Muskulatur, im Fettgewebe und in der Leber vorhanden ist. Beim hydrolytischen Abbau der VLDL-Partikel werden bis zu 80 % der Triglyceride abgespalten. Apoprotein C sowie teilweise Cholesterin und Phospholipide werden wieder auf HDL übertragen. Als Zwischenprodukt entsteht ein intermediäres Lipoprotein (IDL), auch "remnant" genannt, das sich mit dem Apoprotein B an LDL-Rezeptoren der Leber binden kann. Beim Rind, das im Blut nur wenig LDL aufweist, wird IDL zum großen Teil durch Endozytose von der Leberzelle aufgenommen und abgebaut. Bei Spezies mit einem hohen LDL-Gehalt im Blut entsteht nach der Übertragung von Cholesterinestern von HDL auf IDL durch die Einwirkung einer hepatischen Lipase ein LDL-Molekül. Die Abbauprodukte der Lipase, vornehmlich Cholesterin und Phospholipide, werden ebenso wie Apoprotein C auf HDL übertragen. LDL wird von Apoprotein B-spezifischen Rezeptoren in peripheren Organen gebunden und versorgt diese Zielzellen vor allem mit Cholesterin (siehe 2.2.2.1).

HDL scheint eine wichtige Aufgabe bei der Speicherung und Übertragung von Apoprotein C zu besitzen. HAVEL et al. (1973) zeigten, daß nach der Fettabsorption das Apoprotein C von HDL auf VLDL übertragen wird. Damit kann der Abbau des

VLDL-Moleküls durch die Lipoproteinlipase eingeleitet werden. Zudem bietet HDL einen Angriffspunkt für das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT). Es katalysiert die Übertragung der an der 2-Position von Lecithin befindlichen Fettsäure auf Cholesterin und damit die Bildung von Cholesterinestern, die an die "remnant"-Partikel abgegeben werden können (PUPPIONE, 1978).

2.2.2.1 Bedeutung und Vorkommen der LDL-Rezeptoren für den Stoffwechsel in der Zelle

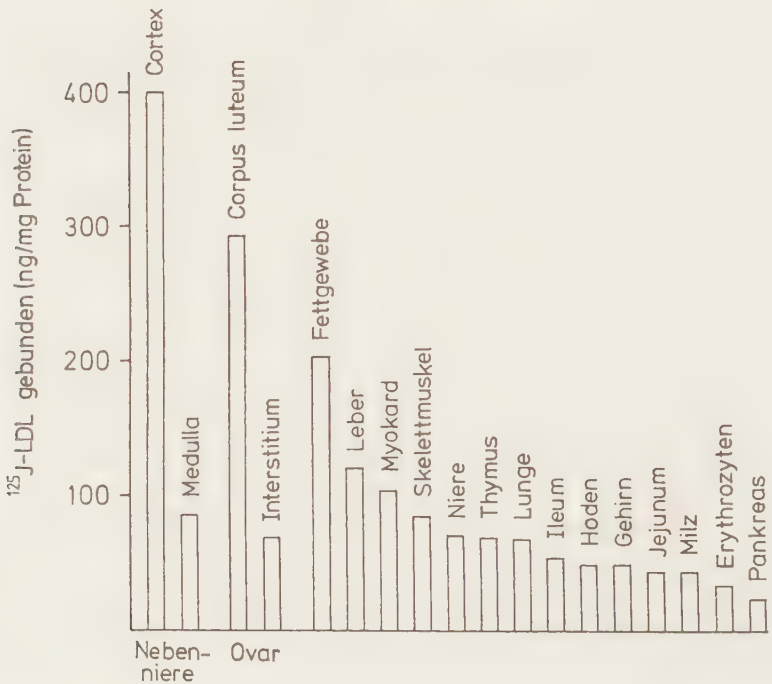
Die Bedeutung von LDL im Cholesterinstoffwechsel, die rezeptorgebundene Aufnahme des Lipoproteins in die Zelle, sowie der Metabolismus in der Zelle wurden von BROWN & GOLDSTEIN (1976) beschrieben. Das im Blut zirkulierende LDL-Molekül wird zunächst durch die Kapillarwand geschleust und erreicht über den Extravasalraum die Zielzellen. Elektrostatische Kräfte binden das Lipoproteinmolekül unter Anwesenheit bivalenter Kationen, z.B. Ca^{++} oder Mn^{++} , an den Rezeptor. Nach Endozytose und Abspaltung des Rezeptors, der an die Zellmembran zurückkehrt, fusioniert das LDL-Partikel mit den Lysosomen. Das Apoprotein wird in Peptide und Aminosäuren zerlegt, von den Cholesterinestern wird die Fettsäure abgespalten. Das freie Cholesterin dient der Synthese von Zellmembranen und als Substrat für Steroidhormone und Gallensäuren. Die Cholesterinaufnahme durch die Zelle wird über die Ausbildung der LDL-Rezeptoren durch ribonukleäre Transkription gesteuert, während Synthese und Speicherung in der Zelle durch die Aktivität von Enzymen geregelt werden.

In-vitro Untersuchungen mit verschiedenen Zellsystemen, z.B. Fibroblasten, Lymphozyten und Granulosazellen, bestätigen

den Stoffwechselweg vom LDL beim Menschen und Tier (NORUM et al., 1983; VELDHUIS et al., 1985).

KOVANEN et al. (1979a,b) stellen beim Rind an Nebennierenrindenzellen in-vitro dieselben Vorgänge fest, zeigen aber darüber hinaus, daß LDL-Rezeptoren auch an homogenisierten Membranen frisch entnommener Gewebeproben vorhanden sind.

Abb. 2: Vorkommen und Bindungskapazität von LDL-Rezeptoren beim Rind (nach KOVANEN et al., 1979a,b)



Diese erweisen sich als LDL-spezifisch, benötigen zweiwertige Kationen für die Bindung der Lipoproteine und unterliegen einer Sättigungskinetik. Die Bindungsaktivität für ^{125}J -LDL, die in-vitro an Membranen frischer Nebennierenzellen gemessen wurde, spiegelt somit die Rezeptoraktivität wieder, die in den Zellkulturen gezeigt werden konnte. Aufgrund der Vergleichsstudie ist davon auszugehen, daß der LDL-Rezeptor in-vitro und in-vivo gleichermaßen funktionsfähig ist. Aus der Abbildung 2 wird nicht nur die Vielzahl der Gewebe mit LDL-Rezeptoren beim Rind, sondern auch ihre LDL-Bindungskapazität deutlich. Wegen der hohen Steroidsyntheseproduktion zeigen die Nebennierenrinde und das Corpus luteum ein deutlich höheres Bindungsvermögen als die übrigen Gewebe.

Neben Cholesterin werden auch andere lipophile Bestandteile über Rezeptoren in die Zelle eingeschleust. TRABER & KAYDEN (1984) weisen eine lipoproteingebundene Aufnahme von Vitamin E durch Fibroblasten nach. Ebenso könnte der β -Carotin-Transport vom Blut in die Milch rezeptorabhängig sein (SCHWEIGERT & ZUCKER, 1988b). Sie finden beim laktierenden Rind einen Abfall des von der LDL-Fraktion transportierten β -Carotins innerhalb von drei Wochen vor der Geburt von 15 auf 5 %.

2.2.3 Markierung von Lipoproteinen mit Lipiden

Auf der Basis veränderter Verzehrsgewohnheiten stieg der Anteil arteriosklerotisch bedingter Herz-Kreislauf-Erkrankungen drastisch an. Da Lipoproteine die nativen Träger vieler lipophiler Substanzen sind, lag es nahe, biochemische Untersuchungen über die beteiligten Fette mit markierten Lipoproteinen anzustellen. Die Markierungsmethoden zielten jedoch nicht nur darauf ab, Lipoproteine zu erhalten, die in

ihren chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften mit den nativen Verbindungen möglichst identisch und deshalb in-vivo und in-vitro einsatzfähig waren. Sie sollten auch dazu beitragen, Erkenntnisse über Bindungsverhältnisse verschiedener Lipide zu erlangen.

Man kann bei der Markierung von Lipoproteinen mit exogenen Lipiden zwei Gruppen unterscheiden: Die Rekombination von Lipoproteinen mit Lipiden, die mit organischen Lösungsmitteln oder Detergentien extrahiert wurden, und die Beladung nativer Lipoproteine mit lipophilen Verbindungen.

2.2.3.1 Rekombinationsmethoden nach Extraktion der Lipide mit organischen Lösungsmitteln

Die isolierten, in Puffer aufgenommenen oder lyophilisierten Lipoproteine werden mit Äther oder Äther/Äthanol versetzt und zur Schonung des Apoproteins bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt extrahiert (AVIGNAN, 1957 und SODHI & GOULD, 1967). Die Polarität des Lösungsmittels bestimmt die Zusammensetzung der entfernten Fette und die Extraktionsdauer. Je polarer das Extraktionsmittel ist, desto größer zeigt sich der Anteil der polaren Lipide (Phospholipide, Cholesterin) im Extrakt (GUSTAFSON, 1964; SCANU et al., 1970).

Um die Lipoproteine zu rekombinieren, werden die Lipide in Petroläther (SODHI & GOULD, 1967), dem Detergens Natriumcholat (SWANEY, 1985) oder als Emulsion (SCANU et al., 1970) angeboten. Während sich Phospholipide und freies Cholesterin spontan in Konzentrationen zu binden vermögen, die denen der nativen Lipoproteine entsprechen, werden Triglyceride und vor allem Cholesterinester nur in Spuren rekombiniert.

Durch die Zufuhr von Energie in Form von Wärme oder Ultraschall können diese apolaren Lipide aber verstärkt im Kern der Lipoproteine angereichert werden, da die polare Oberfläche des Phospholipid-Protein-Komplexes leichter zu überwinden ist (SCANU et al., 1970). Immunodiffusion und Aminosäuresequenzanalyse sprechen dafür, daß die Ultrabeschallung ohne Einfluß auf die Zusammensetzung des Apoproteins ist (RITTER & SCANU, 1977).

Besondere Bedeutung, vor allem im Hinblick auf die zahlreichen Untersuchungen im Cholesterinstoffwechsel, kommt der Extraktion der Kernlipide mit Heptan zu (GUSTAFSON, 1964). Über 99 % der Neutralfette wurden aus den β -Lipoproteinen entfernt und durch gesättigte und ungesättigte Cholesterinester, Retinylpalmitat, Ubiquinon sowie β -Carotin ersetzt (KRIEGER et al., 1978, 1979; CHEN et al., 1980). Die hohe Aggregationsneigung der Lipoproteine, besonders nach der Entfernung des Wasseranteils durch die Lyophilisation, kann durch die Zugabe von Starke vermindert werden.

Die rekombinierten Lipoproteine sind weder in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften (Zusammensetzung, Verhalten bei der Agarosegelelektrophorese, Präzipitation gegenüber Antikörpern, Ausfällung mit Heparin, analytische Ultrazentrifugation) noch im biologischen Verhalten bei Versuchen mit Fibroblasten-Zellkulturen verändert.

Erwähnt werden soll noch die Extraktion des Gesamtplasmas mit Butanol/Diisopropyläther (CHAM & KNOWLES 1976). Die gewonnen Lipide werden in Petroläther wieder zugegeben, wobei sich Phospholipide und freie Fettsäuren in der ursprünglichen Konzentration an Proteine binden, während Triglyceride und Cholesterin nur zu etwa 30 bzw. 7 % wiedergefunden werden.

2.2.3.2 Rekombinationsmethoden nach Extraktion der Lipide mit Detergentien

Ein Überblick über die gängigen Detergentien wurde von HELENIUS & SIMONS (1971) gegeben. Mit Natriumdeoxycholat, Nonidet P 40, Natriumdodecylsulfat und Cetyltrimethylammoniumbromid kann eine vollständige Extraktion vom LDL erfolgen, jedoch zeigen Proben, die mit den letzten beiden Detergentien entfettet werden, veränderte immunochemische Eigenschaften.

Die wäßrige Lipoproteinlösung wird mit einer hohen Konzentration des Detergens versetzt. Durch Gelchromatographie kann das Apoprotein von den Lipiden getrennt werden und steht in gelöster Form zur Verfügung.

Zur Rekombination werden die Lipide an die Wand des Reagenzglases angetrocknet (WATT & REYNOLDS, 1981) oder als Emulsion den Apoproteinen angeboten (GINSBURG et al., 1984). Nach der bei Zimmertemperatur durchgeführten Inkubation und Dialyse ist ein lösliches Lipoprotein verfügbar, dessen Durchmesser etwa 210 Å beträgt (WALSH & ATKINSON, 1983). Das Lipoprotein setzt sich aus 14 % Apoprotein B und jeweils 43 % Phospholipiden sowie Cholesterinestern zusammen. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf über 50°C und anschließender Ultrabeschallung wurden bei LUNDBERG & SUOMINEN (1984) etwa 60 % des angebotenen Cholesterinesters in das Apoprotein eingebaut.

Das rekombinierte Lipoprotein zeigt β -Mobilität und kann von Fibroblasten gebunden, aufgenommen und verstoffwechselt werden.

2.2.3.3 Inkubationsmethoden von Lipoproteinen und Plasma mit Lipiden ohne vorherige Extraktion

Da die Extraktion von Lipoproteinen einen sehr aufwendigen Schritt darstellt, wurde zur Vereinfachung der Methode die direkte Beladung der Lipoproteine mit Lipiden versucht.

Die Lipide, vorwiegend Cholesterinester und Vitamin E, werden den Lipoproteinen meist in gelöster Form zugeführt (FAUST et al., 1977; BARTER & JONES, 1980). Daneben wird die Adsorption der Lipide an Oberflächen, z.B. der Glaswand (GIANTURCO et al., 1979; THOMAS & RUDEL, 1983), Glaskugeln (THELLMAN & SHIREMAN, 1985) oder von Filterpapier beschrieben (ZILVERSMIT et al., 1975). Der Anteil der gebundenen Lipide liegt im Durchschnitt bei etwa 40 %. Er läßt sich auch nicht erhöhen, wenn die Lipidkomponenten als Mikroemulsion zugegeben werden (CRAIG et al., 1982).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3 MATERIAL und METHODEN

Bei der Beschreibung werden die Methoden vorangestellt, die bei allen Versuchen unverändert angewandt wurden. Die jeweils variierenden Techniken sollen bei den Versuchen selbst beschrieben werden.

3.1 Tiere

Die Blutproben für sämtliche durchgeführten Versuche stammten von laktierenden Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh aus dem Lehr- und Versuchsgut in Oberschleißheim oder aus der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub. Die Tiere wurden in Anbindehaltung aufgestellt und mit Heu/Gras, Silage und Kraftfutter gefüttert.

3.2 Probennahme und Probenkonservierung

Das Blut wurde durch Punktion der Vena jugularis entnommen, drei bis fünf Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und nach vollständiger Koagulation für 20 Minuten bei 1.200 xg zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde zur Verringerung enzymatischer Abbauvorgänge mit 0,02 % EDTA versehen und bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Auftrennung der Serumlipoproteine

Die Auftrennung der verschiedenen Lipoproteinfraktionen erfolgte durch selektive Zugabe von Dextransulfat mit unterschiedlichem Molekulargewicht (5.000 bzw. 500.000) und CaCl_2 .

3.3.1 Ausfällung der VLDL/LDL-Fraktion aus dem Serum

Für die Abtrennung dieser Lipoproteinfraktionen wurde ein Dextransulfat-Reagenz verwendet, das aus einem Teil 10 % Dextransulfat 5.000 (Sigma, Deisenhofen) und fünf Teilen einer 1 M CaCl_2 -Lösung bestand. Nach Zugabe von 1,4 ml dieser Lösung zu 10 ml Serum war eine sofortige Trübung sichtbar (STEAD et al., 1978).

Die Proben wurden kurz geschüttelt, für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen und 30 Minuten bei 1.200 xg zentrifugiert. Das gewonnene Präzipitat wurde in 0,5 ml 3 M NaCl-Lösung, pH 7,4, aufgenommen. Der die HDL-Fraktion enthaltende Überstand wurde bei den Versuchen V bis VIII für weitere Analysen benötigt, ansonsten aber verworfen.

3.3.2 Abtrennung der LDL- von der VLDL-Fraktion durch Ultrazentrifugation

Dazu wurden etwa 3 ml einer nach HATCH & LEES (1968) hergestellten Salzlösung mit einer Dichte von 1,006 g/ml in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und mit 2 ml VLDL/LDL-Lösung aus 40 ml Serum unterschichtet. Die Zentrifugation

erfolgte bei einer Kammertemperatur von 15-16°C mit Hilfe einer Ultrazentrifuge, Modell Spinco L 50, und eines "swing out"- Rotors, Modell SW 50/1, beide von Beckman Instruments. Die Laufzeit betrug 20 Stunden bei 114.000 xg.

Durch die Zentrifugation stellte sich eine deutliche Schichtung ein. Die oben flotierende, leicht opaleszente VLDL-Fraktion wurde durch eine breitere, wasserklare Schicht von der mittleren Bande, in der sich die LDL-Fraktion befand, getrennt. Beide Fraktionen konnten mit einer Spinalkanüle vollständig abpipettiert werden.

3.3.3 Darstellung der HDL-Fraktion des Serums

Zur Ausfällung der HDL-Fraktion mußten zu 11,4 ml (10 ml Serum + 1,4 ml Dextransulfat 5.000) des in 3.3.1 beschriebenen Überstandes 4,0 ml Dextransulfatlösung gegeben werden. Allerdings wurde Dextransulfat mit einem Molekulargewicht von 500.000 (Serva, Heidelberg) verwendet. Das übrige Vorgehen wurde bereits bei der Ausfällung von VLDL/LDL beschrieben. Im gewonnenen Überstand fand sich das nicht an Lipoproteine gebundene β -Carotin wieder.

Die notwendige Menge der Dextransulfatlösung wurde in Vorversuchen bestimmt. Da unter physiologischen Voraussetzungen kein freies β -Carotin im Rinderserum vorkommt, wurden steigende Mengen der Dextransulfatlösung zum VLDL/LDL-freien Überstand des Rinderserums gegeben. Die HDL-Fraktion war dann vollständig ausgefällt, wenn kein β -Carotin im Überstand mehr nachweisbar war.

3.4 Analyse der zu untersuchenden Parameter in Lipoproteinen und Serum

3.4.1 Bestimmung von β -Carotin

In Anlehnung an VUILLEUMIER et al. (1983) wurden 0,2 ml Probenmaterial mit 0,4 ml Äthanol vermischt und mit 0,4 ml n-Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde ohne weitere Zwischenschritte für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet.

Das benutzte HPLC-System bestand aus einer Pumpe, Modell 6000 A, einem Injektionsventil mit einer 20 μ l-Schleife, einer 10 μ m Porasil Radial Pak Si-Säule (RCM 100) und einem UV/VIS Detektor, Modell 440. Das Injektionsventil stammte von der Firma Rheodyne Inc., Berkeley, USA; die übrigen Geräte wurden von der Firma Waters Associates Inc., Massachusetts, USA, bezogen. Ein Gemisch aus Hexan und 1,4-Dioxan (1000:10 v/v), das gefiltert und mit Ultraschall entgast wurde, diente als mobile Phase. Die Flußrate betrug 1,8 ml/min. Die β -Carotin-Konzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte durch einen Zweikanalschreiber der Firma Philipps, Holland (Modell PM 8288).

Der β -Carotin-Peak wurde anhand der Retentionszeit identifiziert und die Konzentration über die Peakhöhe berechnet. Als externer β -Carotin-Standard diente ein Präparat der Firma Sigma, Deisenhofen.

3.4.2 Bestimmung von Protein

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lipoproteinen und Zellkulturen richtete sich nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Nach einer Modifikation wurde als Testlösung verwendet:

0,5 ml 2% K-Na-Tartrat
0,5 ml 1% Cu-Sulfat
ad 50,0 ml 2% Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH

Zu 0,1 ml Probenmaterial wurde 0,1 ml heiße, 2 % SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat; Serva, Heidelberg) pipettiert, kurz geschüttelt und 1,0 ml Testreagenz zugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Probe mit 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz (Verdünnung mit Aqua dest. 1:2; Merck, Darmstadt) inkubiert, so daß nach einer halben Stunde die Extinktionsmessung am Spektralphotometer (LKB Ultrospec II, Modell 4050) bei einer Wellenlänge von 760 nm erfolgen konnte. Beim Blankwert wurde das Probenmaterial durch Aqua dest. ersetzt, als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin (Serva, Heidelberg).

3.4.3 Bestimmung von Cholesterin und Triglyceriden

Sowohl die Cholesterin- wie auch die Triglyceridanalysen wurden mit Hilfe eines enzymatischen Farbtests der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt. Bei Cholesterin handelte es sich um den Monotest Cholesterin nach der CHOD-PAP-Methode, bei den Triglyceriden um die Testkombination nach der GPO-PAP-Methode.

Alle beschriebenen Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4.4 Messung der Radioaktivität von ^{14}C -markiertem β -Carotin

Nach der vorhandenen Menge der zu untersuchenden Lösungen wurden 0,5 bzw. 1,0 ml Probenmaterial mit 10 bzw. 15 ml Standard-Szintillationsflüssigkeit (Quickscint 212 von Zinsser, Frankfurt) vermischt. Die Messung im Scintillator (Modell Tri-Carb 4530 von Hewlett-Packard, Ottobrunn) dauerte zwischen 5 und 20 Minuten. Die Ergebnisse wurden in Counts pro Minute (cpm) angegeben.

3.5 Nachweis der rekombinierten β -Lipoproteine sowie der markierten Lipoproteinfraktionen des Serums

Mit Hilfe verschiedener physikalischer und biologischer Methoden sollte geprüft werden, wie sich mit β -Carotin rekombinierte bzw. beladene Lipoproteine im Vergleich zu nativem Material verhielten.

3.5.1 Ausfällung mit Dextransulfat

Die Ausfällung mit Dextransulfat beruht auf elektrostatischen Kräften zwischen den positiven Ladungen des Apoproteins und den negativen Sulfatgruppen des Polysaccharides (BURSTEIN & SCHOLNICK, 1973). Dies setzt voraus, daß die Quartärstruktur und die Ladungen des Proteinanteils durch die Versuchsmethodik nicht verändert werden.

Die Methodik wurde in 3.3.1 und 3.3.3 beschrieben.

Da bei einem Teil der Versuche Rinderserum mit β -Carotin in gelöster Form inkubiert wurde, mußte in Vorversuchen sichergestellt werden, daß ungebundenes β -Carotin mit Dextransulfat nicht reagieren würde.

3.5.2 Analytische Ultrazentrifugation

Ziel der analytischen Ultrazentrifugation ist es, eine Quantifizierung der Verteilung und Konzentration der Lipoproteine selbst oder der von ihnen gebundenen Substanzen zu ermöglichen (BURDON & VAN KNIPPENBERG, 1984).

Die mit Dextransulfat ausgefällten VLDL/LDL-Fraktionen wurden für Konzentrationsbestimmungen zunächst in 5 % NaCl-Lösung aufgenommen. Durch die Dichtebestimmung mit einem Überlaufmeßkölbchen konnte die Menge an kristallinem NaCl berechnet werden, die notwendig ist, um die für die Ultrazentrifugation benötigte Dichte einer 3 M Lösung zu erhalten.

Für die genaue Durchführung der Ausfällung und Ultrazentrifugation siehe Material und Methoden 3.3.1 und 3.3.2.

3.5.3 Elektrophorese

Die Trennbarkeit der Lipoproteine bei der Agarosegelelektrophorese beruht auf den verschiedenen Ladungen ihrer Proteinbestandteile sowie auf der differentiellen Größe und Form der Moleküle.

Die Elektrophorese wurde nach der Methode von NOBLE (1968) modifiziert durchgeführt.

Für die Herstellung des Agarosegels wurde 1g Agarose (High EEO; Serva, Heidelberg) mit 100 ml Tris-Barbiturat-Puffer (Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. 1:5) vermischt.

Die Pufferstammlösung (pH 8,6) nach LAURELL (1965) setzte sich wie folgt zusammen:

2,2400 g Diäthylbarbitursäure
4,4300 g TRIS
0,0533 g Calcium-Lactat
0,0650 g Natriumazid
ad 100,00 ml Aqua dest.

Auf eine 10 x 10 cm große Glasplatte wurden 18 ml des flüssigen Agarosegels gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden 5 μ l Probenmaterial in die Vertiefungen eines slot-formers eingebracht. Am Rand der Platte aufgetragenes bromphenolblau markiertes Albumin zeigte den Verlauf der Trennung an.

Für die Auftrennung wurde eine Multiphorelektrophoresekammer von LKB (Schweden) benutzt. Die Kombination mit einem Kühlaggregat garantierte auf dem Kühlblock eine Temperatur von 5°C. Als Elektrodenpuffer diente eine 1:4 verdünnte Stammlösung. Die Trennung fand in ca. 130 Minuten bei einer Spannung von 280 V statt.

Nach dem Ende des Laufes wurde die Gelschicht in 2 % Essigsäurelösung für 30 Minuten fixiert. Anschließend konnten die Platten mit einem feuchten Filterpapier (Whatman Nr.1) abgedeckt und unter einem Ventilator getrocknet werden.

Die Färbung der Lipide erfolgte mit Sudanschwarz B (ZÖLLNER et al., 1969).

Die Identifizierung der Lipoproteinbanden wurde durch die

Messung der Laufstrecke und die Berechnung der relativen Mobilität ermöglicht. Den Wert erhält man aus dem Quotienten der absolut vom Auftragspunkt zurückgelegten Wegstrecken von LDL zu HDL. Da darin die Laufbedingungen, z.B. die Zeit der Auftrennung und die angelegte Spannung, indirekt berücksichtigt werden, ist ein Vergleich mit Literaturangaben möglich (PUPPIONE et al., 1972).

Die densitometrische Auswertung wurde mit einem Laserdensitometer, Modell Ultroscaan 2202 durchgeführt. Ein Zweikanalschreiber, Modell Z 210, übernahm die Aufzeichnung (LKB, Schweden).

3.5.4 Zellkultur

Die biologische Verfügbarkeit der β -Lipoproteine, die mit radioaktivem β -Carotin markiert wurden, sollte mit Hilfe einer Fibroblasten-Zellkultur getestet werden. BROWN et al. (1980) stellten bei Fibroblasten gesunder Menschen in-vivo und in-vitro eine normale Anzahl funktionsfähiger LDL-Rezeptoren fest.

Die experimentelle Durchführung erfolgte in Anlehnung an GOLDSTEIN et al. (1976).

3.5.4.1 Züchtung der Zellkultur

Normal ausgebildete Fibroblasten eines erwachsenen Mannes wurden als Einschichtzellkultur in 75 ml Zellkulturflaschen angezüchtet, zwischen der 5 und 20 Passage gewonnen und in einem Inkubator (5 % CO₂) bei 37°C erhalten. Als Wachstums-

medium wurde Eagle's minimum essential medium (MEM) verwendet, das Penicillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Tricinchlorid (20 mM, pH 7,4), 24 mM NaHCO₃, 1% nichtessentielle Aminosäuren (v/v) und 10 % fötales Kälberserum enthielt. Die konfluierenden Zellen lösten sich mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung aus den Plastikflaschen. Davon wurden 1×10^5 Fibroblasten in Petrischalen (60 x 15 mm) verbracht und mit 6 ml Wachstumsmedium, dem 10 % fötales Kälberserum zugegeben wurde, weitergezüchtet. Am dritten und am fünften Tag wurde das Wachstumsmedium gewechselt. Nach dem zweiten Mediumwechsel mußten die Zellen für 48 Stunden mit 7 ml MEM, das 10 % lipoproteinfreies Kälberserum enthielt, inkubiert werden. Der Versuch wurde am Tag 7 begonnen, als die Fibroblasten sich in der späten Phase des logarithmischen Wachstums befanden.

3.5.4.2 Herstellung von lipoproteinfreiem Serum

Um bei den Fibroblasten eine möglichst große Zahl von LDL-Rezeptoren zu induzieren, wurden sie für 2 Tage mit Medium inkubiert, das weder lipoprotein gebundenes Cholesterin noch eine andere Cholesterinquelle enthielt. Dadurch läßt sich die Zahl der LDL-Rezeptoren um das 5- bis 10-fache steigern.

Für die Herstellung von lipoproteinfreiem Serum wurde fötales Kälberserum, das eine Dichte von 1,005 g/ml aufwies, nach RADDING and STEINBERG (1960) mit Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,215 g/ml eingestellt. Bei der folgenden 24-stündigen Ultrazentrifugation (114.000 xg) wurden die Lipoproteine vollständig abgetrennt. Das lipoproteinfreie Serum dialysierte für 72 Stunden bei 4°C gegen insgesamt 30 Liter einer 150 mM NaCl-Lösung (pH 7,4). Im Serum konnte kein Cholesterin mehr nachgewiesen werden.

3.5.4.3 Herstellung der Inkubationsmedien

Im Versuch VIII wurde die Aufnahme von lipoproteingebundenem $^{14}\text{-C}$ β -Carotin durch die Fibroblasten im Vergleich zu ungebundenem, nur äthanolisch gelöstem radioaktiven β -Carotin untersucht.

Aus dem mit radioaktivem β -Carotin inkubierten Rinderserum wurden nach 5 Minuten entsprechend 3.3.1 und 3.3.2 die β -Lipoproteine gewonnen und für 24 Stunden gegen 9 Liter einer 150 mM NaCl-Lösung, pH 7,4, bei 4°C dialysiert. Zu 35 ml des MEM (mit 10 % fötalem, lipoproteinfreiem Rinderserum) wurden 2,5 ml der dialysierten LDL-Lösung gemischt.

Für die Herstellung des Vergleichsansatzes wurde $^{14}\text{-C}$ β -Carotin in reinem Äthanol gelöst und in einer Konzentration von 0,1 % dem Eagle's minimum essential medium (plus 10 % lipoproteinfreies Kälberserum) zugegeben.

3.5.4.4 Inkubation der Zellen

Die Einschichtzellkulturen wurden bei 37°C mit je 6 ml des LDL- bzw. Äthanol-haltigen Wachstumsmediums inkubiert. Nach 30 Minuten, 2 und 6 Stunden wurden die Medien entfernt, und die Fibroblasten dreimal mit 3 ml eiskalter Lösung A (0,15 M NaCl, 50 mM TRIS, 2mg/ml Albumin, pH 7,4) gewaschen. Jeder Ansatz wurde noch zweimal für je 10 Minuten bei 4°C mit Lösung A inkubiert, einmal schnell mit eiskalter Lösung B (0,15 M NaCl, 50 mM TRIS, pH 7,4) gewaschen und in 1 ml 0,1 N NaOH gelöst. Nach 15 Minuten wurde das Zellhydrolysat abpipettiert und die Petrischale mit 1 ml NaOH nachgereinigt. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde mikroskopisch überprüft.

4

ERGEBNISSE

4.1 Rekombination von β -Lipoproteinen mit β -Carotin

4.1.1 Methodik

Die Versuche wurden prinzipiell in Anlehnung an die von KRIEGER et al. (1978) beschriebene Methode durchgeführt. Im Hinblick auf eine Verbesserung und Beschleunigung dieser Technik wurden eine Vielzahl von Veränderungen eingeführt. Diese sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

Die Gewinnung der β -Lipoproteine durch selektive Ausfällung mit DS 5.000 und anschließender Ultrazentrifugation ist bereits unter Material und Methoden 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt.

Für die Dialyse wurden 48 mg LDL-Protein in 15 ml 0,15 M NaCl- und 0,3 mM Na-EDTA-Lösung, pH 7,4, aufgenommen und bei 4°C für 60 Stunden gegen insgesamt 24 Liter 0,3 mM Na-EDTA-Lösung (Merck, Darmstadt), pH 7,4, inkubiert. Das Dialysenwasser wurde viermal gewechselt.

Die Lyophilisation erfolgte über Nacht, bis die Proben getrocknet waren. Dazu wurde ein Aliquot des Dialysates mit 1,94 mg LDL-Protein in ein Glasröhrchen pipettiert, das mit Chromschwefelsäure gereinigt und mit Silikonlösung (Merck, Darmstadt) beschichtet war. Nach der Zugabe von 25 mg gereinigter Kartoffelstärke (Merck, Darmstadt) und kurzem Schütteln wurden die Proben unter leicht drehenden Bewegungen mit Hilfe einer selbstkonstruierten Vorrichtung sehr schnell in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Zur Schonung des Apoproteins und aus arbeitstechnischen Gründen fand die Extraktion des apolaren Lipidanteils bei -20° statt. Nach der Zugabe von 5 ml kaltem n-Heptan wurden die Proben ca. 30 Sekunden auf dem Vortex-Mixer geschüttelt und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Alle 10 bis 15 Minuten wurde das Schütteln wiederholt. Zur Trennung des Stärke-Lipoprotein-Anteils von der organischen Phase mußten die Glasröhrchen für 10 Minuten bei $1.200 \times g$ und 4°C zentrifugiert werden. Die Heptan-Phase, die abpipettiert wurde, wies zunächst eine deutliche Gelbfärbung auf, nach drei weiteren Extraktionen jedoch (jeweils 30 Minuten Inkubationsdauer) zeigte sie sich farblos.

Das gewonnene Apoprotein wurde für die Rekombination mit 0,25 ml n-Heptan, in dem β -Carotin in steigenden Konzentrationen gelöst war, versetzt, kurz geschüttelt und für 90 Minuten bei -20°C stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben in ein Eisbad gestellt und mit vorgereinigtem Stickstoff getrocknet (etwa 70 Minuten). Das LDL-Stärke-Pellet konnte in 2 ml 10 mM Tricin-Puffer (Sigma, Deisenhofen), pH 8,4, aufgenommen, durch leichtes Schütteln wieder in Lösung gebracht und 41 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert werden. Einem möglichen β -Carotin-Verlust durch oxidative Schädigung wurde durch Begasen der Proben mit Stickstoff vorgebeugt.

Bei den Versuchen II, III und IV wurden die Proben nach der Aufnahme in Tricin-Lösung sofort für jeweils 2,5 Minuten im Eisbad ultrabeschallt.

Die Abtrennung der gelösten, rekombinierten Lipoproteine von der Stärke, den denaturierten LDL-Anteilen und dem nicht rekombinierten β -Carotin war durch Zentrifugation bei $1.200 \times g$ und 4°C in 10 Minuten möglich. Da bakterielles Wachstum während der gesamten Rekombinationsphase nicht vollständig

auszuschließen war, wurde die Lipoproteinlösung noch mit einem sterilen und pyrogenfreien Membranfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) mit 45 μ m Porengröße gereinigt.

Zum Nachweis der rekombinierten β -Lipoproteine wurden diese mit 1,5 ml Dextransulfat-Lösung (MG 500.000) versetzt, 20 Minuten stehengelassen und eine halbe Stunde bei 1.200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und das Präzipitat in 2,0 ml 5 % NaCl-Lösung, pH 7,4, aufgenommen.

4.1.2 Versuchsanordnung und Ergebnisse

In Vorversuchen sollte das Extraktionsverhalten von β -Carotin und Cholesterin bei der lyophilisierten LDL-Fraktion untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß nach viermaliger Extraktion mit Heptan beide Lipidbestandteile vollständig aus den gelösten wie den ausgefallenen Lipoproteinen entfernt werden konnten. Die Bestimmung der einzelnen Extrakte ergab, daß bei der ersten Extraktion über 89 % des gesamten β -Carotins aus den Lipoproteinen gelöst wurden. Bei der zweiten und dritten Extraktion fanden sich 7,5 und 0,7 % wieder. Im letzten Extrakt war kein β -Carotin mehr nachweisbar.

4.1.2.1 Versuch I: Die Rekombination von gelösten β -Lipoproteinen mit β -Carotin ohne Anwendung von Ultraschall

Nach der Dialyse wurden die LDL-Proben mit der zugegebenen Kartoffelstärke lyophilisiert, mit n-Heptan extrahiert und mit β -Carotin rekombiniert. Der β -Carotin-LDL-Stärke-Rest wurde nach der Trocknung in Tricin-Puffer aufgenommen.

Wie aus Tab.2 zu entnehmen ist, wurden 1,94 mg LDL-Protein pro Probe eingesetzt. Davon konnten nach der Rekombination zwischen 60,3 und 71,6 % wiedergefunden werden. Der Proteingehalt nahm bei der Inkubation mit 5,7 bis 23,8 μg β -Carotin von 1,17 auf 1,37 mg zu. Die Wiederfindung beim Nullwert lag bei 1,32 mg.

Tab. 2: Eingesetzte und rekombinierte β -Carotin- und Proteinkonzentration in β -Lipoproteinen

zugegebenes β -Carotin ¹	rekombiniertes β -Carotin	rekombiniertes Protein	Verhältnis β -Car./Prot. ²
$\mu\text{g}/\text{Probe}$	$\mu\text{g}/\text{Probe}$ (%)	mg/Probe (%)	$\mu\text{g}/\text{mg}$
0,00	0,00 (0,0)	1,32 (68,0)	0,00
5,70	1,30 (22,8)	1,17 (60,3)	1,11
8,70	1,46 (16,8)	1,27 (65,5)	1,15
14,30	1,57 (11,0)	1,34 (69,1)	1,17
18,30	2,45 (13,4)	1,32 (68,0)	1,86
23,80	4,49 (18,9)	1,37 (71,6)	3,28

1) 1,94 mg eingesetztes LDL-Protein enthielten 2,80 μg β -Carotin

2) Das Gewichtsverhältnis (β -Carotin/Protein) der eingesetzten Probe betrug 1,44

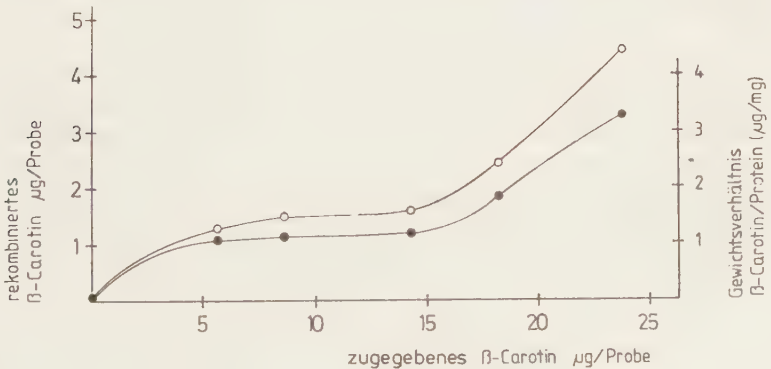
Für β -Carotin zeigt sich, absolut berechnet, eine stetige Erhöhung seiner Konzentration im Rekombinat. Diese Abhängigkeit ist aber nicht linear. Die Verlaufskurve macht deutlich, daß das rekombinierte β -Carotin bei einer Zugabe von etwa 5 bis 15 μg pro Probe nur von 1,30 auf 1,57 μg an-

steigt, um dann im Bereich von 15 bis 24 μg sehr deutlich bis auf 4,49 μg zuzunehmen (Abb.3).

Setzt man das lipoproteingebundene β -Carotin allerdings zur zugegebenen Menge prozentual in Beziehung, so wird erkennbar, daß bei der Inkubation mit 5,7 μg β -Carotin 22,8 % rekombiniert wurden. Dies reduziert sich bis 15 μg auf 11 %, erreicht aber bei 24 μg mit 19 % fast wieder den Ausgangswert.

Aus den Werten für β -Carotin und Protein wurde ihr Konzentrationsverhältnis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) berechnet. Der graphische Verlauf zeigt eine große Ähnlichkeit mit der β -Carotin-Verlaufskurve. Der β -Carotin/ Protein-Quotient scheint somit abhängig von der zugegebenen Menge an β -Carotin. Er steigt zwischen 5 und 15 μg zugegebenem β -Carotin geringfügig von 1,11 auf 1,17 an, erhöht sich bei 24 μg β -Carotin aber auf 3,28. Der Quotient der eingesetzten LDL-Fraktion betrug 1,44.

Abb. 3: Rekombiniertes β -Carotin (○) und β -Carotin/Protein-Gewichtsverhältnis (●) in Abhängigkeit von der zugegebenen β -Carotin-Menge ohne Ultrabeschallung



Zusammenfassend deutet die β -Carotin-Konzentration im Rekombinat auf eine Abhängigkeit von der dem Apoprotein angebotenen Menge hin. Dies könnte auch für den rekombinierten Proteinanteil zutreffen.

Die Ausfällung der rekombinierten Lipoproteine mit Dextransulfat zeigte, daß β -Carotin im Überstand nicht nachweisbar war. Das bedeutet, daß das gesamte, in Tricin-Puffer gelöste β -Carotin an Lipoproteine gebunden wurde. Diese Feststellung besitzt auch für die nachfolgenden Versuche Gültigkeit und wird deshalb nicht mehr gesondert aufgeführt.

4.1.2.2 Versuch II: Die Rekombination von gelösten β -Lipoproteinen mit β -Carotin unter Einwirkung von Ultraschall

In Abwandlung des bereits beschriebenen Versuches wurde die Ultraschallung als einzige Neuerung eingeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die rekombinierte LDL-Proteinkonzentration nur geringfügig zwischen 1,34 und 1,40 mg schwankt. Sie ist damit fast gleichbleibend konstant und dürfte unabhängig von der Menge des zugegebenen, exogenen β -Carotins sein.

Im Gegensatz dazu wurde deutlich, daß die β -Carotinmenge im Rekombinat, wie bereits in Versuch I, abhängig von ihrer angebotenen Konzentration ist. Sie stieg bei der Inkubation nahezu linear von 1,50 μg auf 5,11 μg β -Carotin an. Eine entsprechende lineare Abhängigkeit ist auch im β -Carotin/Protein-Gewichtsverhältnis gegeben, dessen Quotient sich kontinuierlich von 1,12 auf 3,73 erhöht.

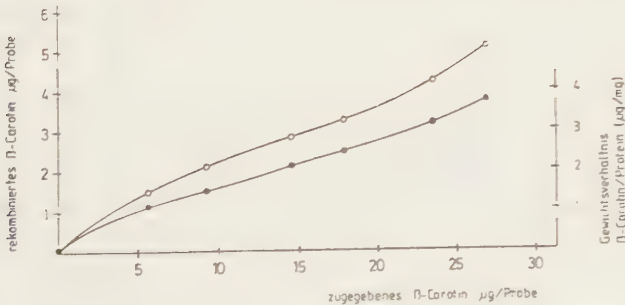
Tab. 3: Eingesetzte und rekombinierte β -Carotin- und Protein-
konzentration in β -Lipoproteinen

zugegebenes β -Carotin ¹ $\mu\text{g}/\text{Probe}$	rekombiniertes β -Carotin $\mu\text{g}/\text{Probe}$ (%)	rekombiniertes Protein mg/Probe (%)	Verhältnis β -Car./Prot. ² $\mu\text{g}/\text{mg}$
0,00	0,02 (0,7)	1,40 (72,2)	0,01
5,70	1,50 (26,3)	1,34 (69,1)	1,12
9,30	2,12 (22,8)	1,40 (72,2)	1,51
14,60	2,86 (19,6)	1,37 (70,6)	2,09
17,90	3,28 (18,3)	1,34 (69,1)	2,45
23,60	4,24 (18,0)	1,34 (69,1)	3,16
27,00	5,11 (18,9)	1,37 (70,6)	3,73

1) 1,94 mg eingesetztes LDL-Protein enthielten 2,80 μg
 β -Carotin

2) Der Quotient des eingesetzten Lipoproteins betrug 1,44

Abb. 4: Rekombiniertes β -Carotin (○) und β -Carotin/Protein-
Gewichtsverhältnis (●) in Abhängigkeit von der zuge-
gebenen β -Carotin-Menge mit Ultraschallung



Allerdings scheint die prozentuale Rekombinationsrate für β -Carotin einer Sättigung zu unterliegen. Mit 26,3 % liegt sie am Anfang sehr hoch, sinkt anschließend bis zur Zugabe von etwa 15 μ g auf 18 % ab und bleibt danach annähernd konstant.

4.1.2.3 Versuch III: Die Rekombination von ausgefallenen β -Lipoproteinen mit β -Carotin unter Einwirkung von Ultraschall

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob und wieviel β -Carotin von ausgefallenen, aber nicht denaturierten Lipoproteinen gebunden werden kann.

Die Löslichkeit der Lipoproteine ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Bei einem pH-Wert unter 7,0 beginnen die Lipoproteine auszufallen. Dieser Umstand wurde bei der Dialyse ausgenutzt.

48 mg LDL-Protein wurden mit 15 ml 0,15 M NaCl- und 0,3 mM Na-EDTA-Lösung vermischt. Der pH-Wert der Lösung betrug 5,5. Die Dialyse wurde gegen 0,3 mM Na-EDTA-Lösung, pH 5,5, durchgeführt. Bereits nach wenigen Stunden stellte sich eine deutliche Trübung der Dialyselösung ein. Die mattgelben Lipoproteine sanken entsprechend der Schwerkraft nach unten und wurden von einer leicht getrübbten, hellgelben Phase überschichtet. Wegen ihrer Heterogenität mußte diese Lösung vor der Lyophilisation sehr gut auf dem Vortex-Mixer geschüttelt werden.

Mit der Erhöhung des pH-Wertes auf über 7,0 konnte gezeigt werden, daß die Ausfällung des Lipoproteins durch Veränderung der H^+ -Ionenkonzentration reversibel ist. Kurze Zeit nach der Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH ver-

schwand die Trübung wieder, und das Dialysat zeigte eine klare, homogene und sattgelbe Färbung.

Die rekombinierten, in Puffer aufgenommenen Lipoproteine konnten in der Zentrifuge bei 1.000 rpm in 3 Minuten nur unbefriedigend von der Stärke getrennt werden. Nach dem Abpipettieren der Puffer-Lösung wurden die Lipoproteine mit Dextransulfat 500.000 ausgefällt, abzentrifugiert und in 5 % NaCl-Lösung aufgenommen.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß keine vollständige Trennung der Lipoproteine von der Stärke erreicht wurde. Außerdem mußte auf die Filtration mit einem 45 µm Membranfilter verzichtet werden, so daß auch bakterielles Wachstum nicht völlig auszuschließen ist.

Tab. 4: Eingesetzte und rekombinierte β -Carotin- und Proteinkonzentration in ausgefallenen β -Lipoproteinen

zugegebenes* β -Carotin ¹	rekombiniertes β -Carotin	rekombiniertes Protein	Verhältnis β -Car./Prot. ²
µg/Probe	µg/Probe (%)	mg/Probe (%)	µg/mg
6,70	1,19 (17,8)	1,31 (67,5)	0,91
10,70	1,54 (14,4)	1,24 (63,9)	1,24
16,40	1,69 (10,3)	1,34 (69,1)	1,26
20,40	2,56 (12,5)	1,29 (66,5)	1,98
24,80	3,08 (12,4)	1,26 (65,0)	2,44
29,70	3,67 (12,4)	1,18 (60,8)	3,11

1) 5,96 µg β -Carotin waren an 1,94 mg LDL-Protein gebunden

2) Das Verhältnis im Ausgangsmaterial betrug 3,07

Die Wiederfindung des LDL-Proteins bewegte sich ohne erkennbaren Zusammenhang zur angebotenen, exogenen β -Carotinkonzentration in einem relativ weiten Bereich von 60,8 bis 69,1 %.

β -Carotin wurde in einer Konzentration von 6,7 bis 29,7 μg dem Apoprotein zugegeben. Zwischen 1,19 und 3,67 μg β -Carotin konnten im Rekombinat nachgewiesen werden. Dies entspricht durchschnittlich 10 bis 14 % des eingesetzten β -Carotins. Nur bei der Zugabe von 6,7 μg β -Carotin wurden über 17 % wiedergefunden.

Das β -Carotin/Protein-Gewichtsverhältnis zeigt gegenüber den vorhergehenden Versuchen keine Besonderheiten.

4.1.2.4 Versuch IV: Modifikationen der Rekombinationsphase unter Einwirkung von Ultraschall

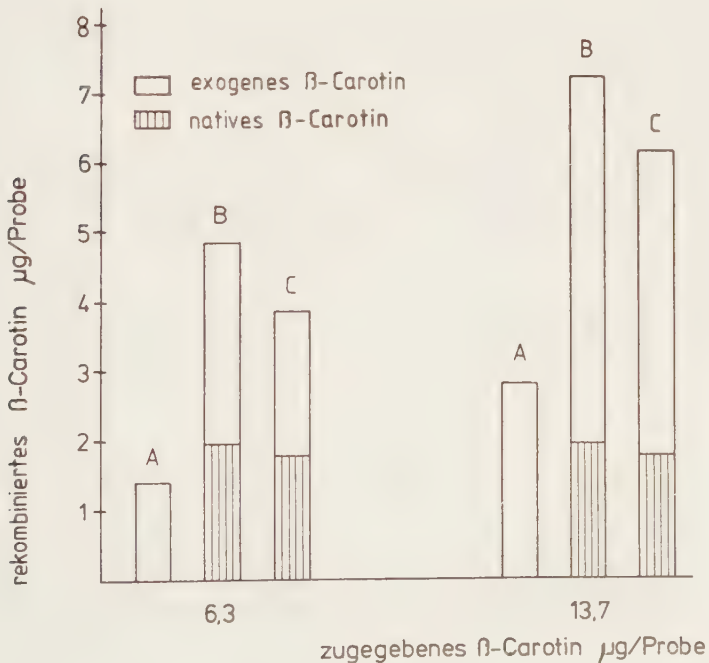
Das gelöste LDL sollte mit β -Carotin rekombiniert werden im Hinblick auf einen späteren Einsatz an Zellkulturen. Für die Ausbildung der LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche und die Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen gilt Cholesterin als regulierende Substanz (siehe 3.5.4.2).

Der Versuch wurde als Vergleich zur Rekombination nur mit β -Carotin nach der unter 4.1.1 beschriebenen Methodik -im folgenden Methode A genannt- durchgeführt. Bei der Methode B wurde β -Carotin zusammen mit dem exogenen Extrakt angeboten. Dazu mußte dieses in einem Glaskolben gesammelt und mit einem Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 38 bis 40°C eingengt werden. Die Methode C untersuchte die Bindungsfähigkeit von β -Carotin an lyophilisierte, nicht extrahierte Lipoproteine.

Zu beachten ist, daß die Dauer der Ultrabeschallung auf zwei Minuten reduziert wurde.

Die Ergebnisse der Methode A unterstreichen die bereits im Versuch II dargestellten Rekombinationsraten für β -Carotin sowie die angenommene Abhängigkeit der Proteinwiederfindung vom β -Carotin-Angebot.

Abb. 5: Rekombiniertes β -Carotin in Abhängigkeit von der zugegebenen β -Carotin-Menge bei Anwendung der Methoden A, B und C mit Ultrabeschallung



Tab. 5: β -Carotin-, Protein-, Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in rekombinierten β -Lipoproteinen

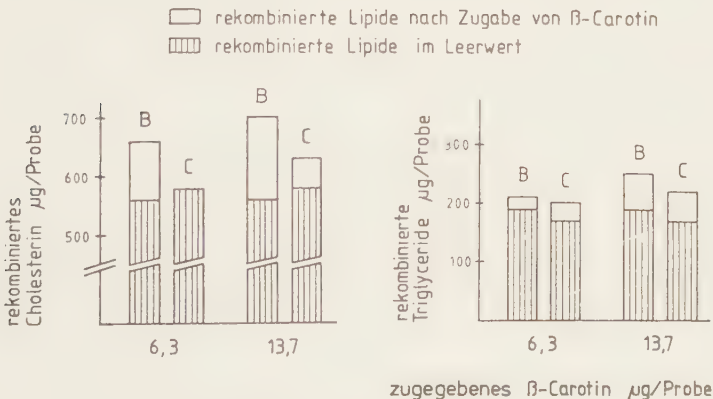
zugegebenes β -Carotin ¹ $\mu\text{g}/\text{Probe}$	rekombiniertes Protein				Verhältnis	
	rekombiniertes β -Carotin ² $\mu\text{g}/\text{Probe}$ (%)	rekombiniertes Protein mg/Probe (%)	rekombiniertes Cholesterin ³ $\mu\text{g}/\text{Probe}$ (%)	rekombinierte Triglyceride ³ $\mu\text{g}/\text{Probe}$ (%)	β -Car./ Protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Trigly./ Protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
0.00	0.04 (0.5)	1.19 (61.3)	0.0 (0.0)	n.b.	0.03	0.0 n.b.
6.30	1.42 (22.5)	1.27 (65.5)	0.0 (0.0)	n.b.	1.12	0.0 n.b.
13.70	2.80 (20.4)	1.32 (68.0)	0.0 (0.0)	n.b.	2.12	0.0 n.b.
8.61 ⁴	1.97 (22.9)	1.41 (72.7)	560 (29.0)	190 (36.5)	1.40	397 135
14.91 ⁵	2.86 (45.4) ⁶	1.34 (69.1)	660 (34.2)	210 (40.4)	3.60	492 157
22.31 ⁵	5.26 (38.4) ⁶	1.37 (70.6)	700 (36.3)	250 (48.1)	5.28	511 182
8.61 ⁴	1.79 (20.8)	1.49 (76.8)	580 (30.1)	170 (32.7)	1.20	389 114
14.91 ⁵	2.07 (32.9) ⁶	1.48 (76.3)	580 (30.1)	200 (38.5)	2.61	392 135
22.31 ⁵	4.36 (31.8) ⁶	1.52 (78.4)	630 (33.6)	220 (42.3)	4.05	414 145

1) Bei allen Proben wurden 1.94 mg LDL-Protein eingesetzt 2) An 1.94 mg des eingesetzten LDL-Proteins waren 8.61 μg β -Carotin gebunden 3) Der Cholesteringehalt der eingesetzten Probe betrug 1930 μg , die Triglyceridkonzentration 520 μg
4) Hier handelt es sich um die Leerwerte: Bei Methode B wurde das eingeeingte Extrakt in 0.25 ml Heptan aufgenommen und dem Apoprotein zugegeben, bei Methode C wurde dieselbe Menge Heptan zum Lyophilisat pipettiert 5) Die Werte stellen das gesamtzugegebene β -Carotin dar, d.h. Methode B) β -Carotin des eingeeingten Extraktes, und Methode C) des Lyophilisates plus der exogenen Menge (6.30 bzw. 13.70 $\mu\text{g}/\text{Probe}$) 6) Bei diesen Resultaten ist der β -Carotin-Gehalt des entsprechenden Leerwertes bereits abgezogen n.b.) nicht bestimmt

Die Zugabe von β -Carotin mit dem eingeeengten Extrakt (Methode B) ließ die Bindungsfähigkeit seines exogenen Anteils auf bis zu 45 % ansteigen. Dies bedeutet eine Verdopplung der Rekombinationsrate im Vergleich zur Methode A. Wird hingegen das im Rekombinat gefundene β -Carotin zum insgesamt angebotenen β -Carotin (extrahierter + exogener Anteil) in Relation gesetzt, so kann gegenüber dem Nullwert nur eine Steigerung um 10 Prozentpunkte auf 32 %, d.h. von 1,97 μg auf 4,83 bzw. 7,23 μg . erreicht werden.

Interessanterweise scheint auch der Einbau von Triglyceriden und Cholesterin in das Lipoprotein von der β -Carotin-Konzentration abhängig zu sein. Er konnte bei Cholesterin von 560 auf 700 $\mu\text{g/Probe}$, bei den Triglyceriden um 60 $\mu\text{g/Probe}$ auf 250 μg gesteigert werden. Die β -Carotin-Zugabe hatte somit eine Erhöhung der Rekombinationsrate für Cholesterin um 25 %, für die Triglyceride sogar um 31 % zur Folge. Beachtlich

Abb. 6: Rekombinierte Lipide in Abhängigkeit von der zugegebenen β -Carotin-Menge bei Anwendung der Methoden B und C mit Ultraschall



ist zudem, daß zwar das gesamte Cholesterin aus dem Lipoprotein extrahiert wurde, aber nur etwa ein Drittel rekombiniert werden konnte. Bei den Triglyceriden wurden bis zu 48 % wiedergefunden, jedoch ist zu berücksichtigen, daß die nach der Extraktion noch gebundene Menge nicht bekannt ist.

Wie aus der Tabelle 5 zu entnehmen ist, konnten bei der Methode C mit 1,5 mg Protein im Gegensatz zur Methode B etwa 0,1 mg mehr wiedergefunden werden. Dies wirkte sich jedoch nicht auf die Rekombination von exogenem β -Carotin aus. Nur knapp über 30 % ließen sich im Rekombinat nachweisen. Trotz der Einfachheit der Methode wurden, im Gegensatz zu Methode B, überraschenderweise weniger Cholesterin und Triglyceride gefunden. Zwar sind prozentual gesehen auch hier mehr Triglyceride als Cholesterin zu finden, doch im Vergleich zur Methode B lagen die Maximalwerte mit 220 $\mu\text{g}/\text{Probe}$ für Triglyceride und 630 $\mu\text{g}/\text{Probe}$ für Cholesterin nicht so hoch. Deutlich, allerdings nur für Triglyceride, scheint die Wiederfindung abhängig zu sein von der zugegebenen β -Carotin-Konzentration.

4.2 Inkubation von Rinderserum mit β -Carotin

4.2.1 Inkubation von Rinderserum mit ungelöstem β -Carotin (Methode)

In Anlehnung an die Methode von THOMAS & RUDEL (1982) wurden 24 μg β -Carotin in 0,5 ml Petroläther gelöst. Diese wurden in verschließbare, gründlich mit Chromschwefelsäure gereinigte Glasröhrchen pipettiert und unter vorgereinigtem Stickstoff eingengt. Zur gleichmäßigen Verteilung des β -Carotins über die Glaswand wurden die Reagenzröhrchen horizontal gehalten und leicht gedreht.

Nach der Zugabe von 6 ml Rinderserum wurden die Proben mit vorgereinigtem Stickstoff begast, dicht verschlossen und bei 37° C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Unterbrechung der Inkubation wurde das Rinderserum nach 30 Minuten, 1, 3, 5 und 24 Stunden abpipettiert. Ein Aliquot von 1 ml reichte für die Serumanalyse aus, bei den restlichen 5 ml wurden die Lipoproteinfraktionen gewonnen (siehe Material und Methoden 3.3.1 und 3.3.3) und in 5 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Ergebnisse der inkubierten Serumproben wurden mit einem Leerwert verglichen und stellen immer den Mittelwert aus zwei Ansätzen dar.

4.2.1.1 Versuch V: Transfer von ungelöstem β -Carotin in Serum und Lipoproteine

Die Ergebnisse zeigen, daß während der gesamten Inkubationszeit kein Transfer von β -Carotin in das Serum oder auf die Lipoproteine stattfand.

Dagegen kam es zu einer Änderung der Verteilung von nativ gebundenem β -Carotin auf die Lipoprotein-Fraktionen. Während bei der VLDL/LDL-Fraktion der β -Carotin-Gehalt in 5 Stunden von 0,22 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,15 $\mu\text{g/ml}$ abnahm, war in der HDL-Fraktion ein Anstieg um 0,07 $\mu\text{g/ml}$ zu verzeichnen. Die Übertragung des β -Carotins von VLDL/LDL auf HDL schien während dieser 5 Stunden gleichmäßig zu verlaufen, doch ist wegen der geringen Konzentrationen und der kleinen Probenzahl keine gesicherte Aussage möglich.

Nach 24 Stunden nahm die β -Carotin-Konzentration sowohl im Serum wie in den Lipoproteinen ab. Jedoch fiel auch die Wiederfindung (Summe aus VLDL + LDL + HDL + Überstand prozentual zur Menge im Serum berechnet) von durchschnittlich 99 % auf 92 % ab.

Tab. 6: β -Carotin-Konzentrationen in Serum und Lipoproteinen während der 24-stündigen Inkubation

Zeit (Std)	0	0,5	1	3	5	24
<u>β-Carotin</u> <u>$\mu\text{g/ml}$</u>						
Serum	1,26	1,24	1,26	1,26	1,24	1,19
VLDL/LDL	0,22	0,21	0,19	0,18	0,15	0,14
HDL	1,01	1,03	1,06	1,07	1,08	0,96
Summe ¹	1,23	1,24	1,25	1,25	1,23	1,10
% Summe/ Serum	97,6	100,0	99,2	99,2	99,2	92,4

1) Im Überstand war kein β -Carotin nachweisbar

4.2.2 Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch gelöstem β -Carotin (Methode)

In Abänderung der von BARTER and JONES (1980) beschriebenen Technik wurden 50 ml Blutserum in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben. Unter leichtem Schütteln wurde in Äthanol gelöstes β -Carotin hinzupipettiert. Die Endkonzentration des Äthanols betrug 1 % mit Ausnahme von Versuch VI (Tab.8), bei dem 2 % Alkohol zugegeben wurden. Die Proben wurden mit vorgereinigtem Stickstoff begast, mit Glasstopfen und Parafilm dicht verschlossen und im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 5 Minuten, 1, 3 und 5 Stunden wurden insgesamt 12 ml Blutserum entnommen. Davon wurden 2 ml für die Serumanalyse und zweimal 5 ml (Ansatz als Doppelproben) für die Gewinnung der Lipoproteine benötigt. Das Rinderserum wurde bewußt bei Zimmertemperatur mit dem Dextransulfatreagensatz versetzt, um die Ausfällung nicht zu gefährden, obwohl wahrscheinlich geringe Veränderungen in der Verteilung des β -Carotins auf die Lipoproteinfraktionen erleichtert wurden.

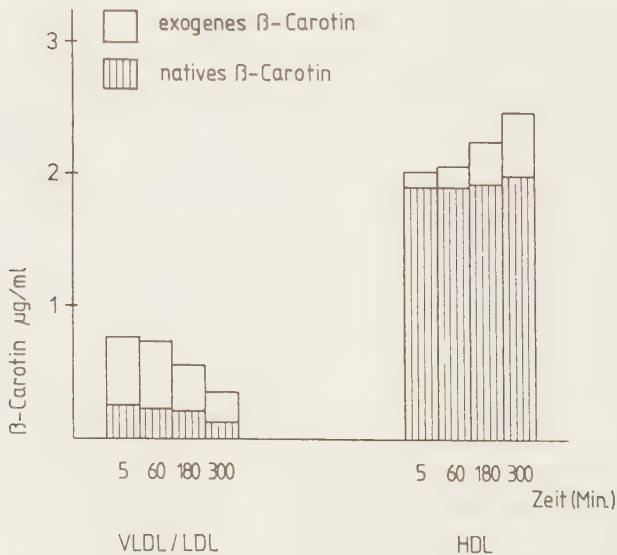
Da β -Carotin in Äthanol verhältnismäßig schwer löslich ist, wurde zunächst Petroläther (30 - 50°C) zugegeben, bis makroskopisch keine ungelösten Partikel mehr sichtbar waren. Der Petroläther wurde unter vorgereinigtem Stickstoff wieder eingedampft, das β -Carotin aber blieb in Äthanol gelöst. Die Proben wurden noch mit einem für organische Lösungsmittel geeigneten Membranfilter (0,5 μ m) von Millipore, Molsheim, gereinigt.

4.2.2.1 Versuch VI: Verteilung des äthanolisch gelösten β -Carotins auf die Lipoproteine und Verhalten von β -Carotin und Cholesterin während der Inkubation

Die Befürchtung, daß Äthanol zur Denaturierung und Ausfällung von Serumproteinen führen könnte, erwies sich nach der Durchführung von Vorversuchen als hinfällig. Dazu wurde das Serum über längere Zeit mit Alkohol versetzt und zentrifugiert. Selbst nach der Zugabe von 2 % Äthanol war kein ausgefallenes Protein sichtbar.

Knapp 12 % des β -Carotins waren im eingesetzten Rinderserum physiologischerweise an VLDL/LDL gebunden (Tab.7).

Abb. 7: β -Carotin-Konzentration der Lipoproteine nach Inkubation des Rinderserums mit $0,6 \mu\text{g}$ β -Carotin/ml



Tab. 7: Zeitlicher Verlauf der β -Carotin-, Cholesterin- und Protein-konzentrationen in Serum, Lipoproteinen und Überstand nach der Inkubation mit $0,64 \mu\text{g } \beta$ -Carotin/ml

[illegible]

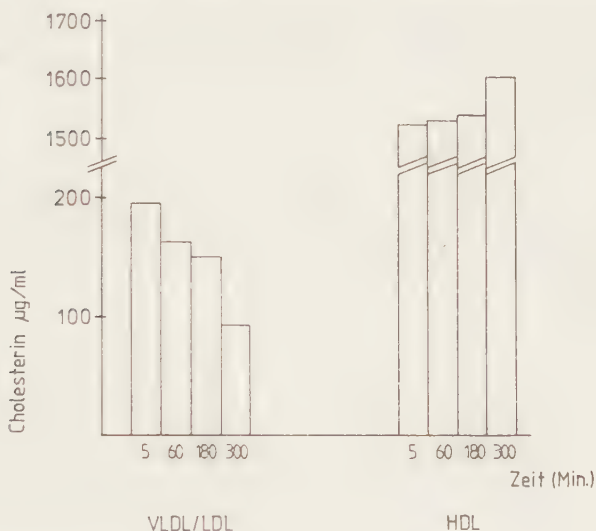
Durch die Zugabe von exogenem β -Carotin stieg der Gehalt in den Lipoproteinen um 0,6 bzw. 1,5 $\mu\text{g/ml}$ an. Mit 71 bzw. 81 % fand sich nach 5 Minuten der größte Teil in der VLDL/LDL-Fraktion wieder, während zwischen 20 und 30 % im HDL nachgewiesen wurden. Die im Überstand befindliche, nicht-lipoprotein gebundene β -Carotin-Konzentration war mit etwa 4 % des zugegebenen Anteils sehr gering.

Im Verlaufe der Inkubation verlor β -Carotin seine anfangs höhere Affinität zu den lipidreicheren VLDL und LDL zugunsten einer Übertragung auf HDL. Nach 5 Stunden waren 55 bis 65 % des gesamten, exogenen und in-vivo gebundenen β -Carotins von VLDL/LDL auf HDL übertragen. Jedoch wurde auch nach dieser Zeit die Konzentration des Leerwertes nicht erreicht.

Die Menge des von der VLDL/LDL-Fraktion abgegebenen β -Carotins änderte sich mit zunehmender Inkubationsdauer. Bei der Zugabe von 0,6 $\mu\text{g/ml}$ β -Carotin zum Serum stieg der Transfer kontinuierlich von 0,05 auf 0,23 $\mu\text{g/ml}$ an. Hingegen war nach der Zugabe von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ β -Carotin die Übertragung mit 0,38 $\mu\text{g/ml}$ anfangs am größten, um danach auf 0,14 $\mu\text{g/ml}$ abzufallen.

Auch beim in-vivo gebundenem Gesamtcholesterin konnte ein Transfer von VLDL/LDL auf HDL beobachtet werden. Die übertragene Menge betrug ca. 110 bzw. 80 $\mu\text{g/ml}$. Dies entspricht in beiden Fällen über 55 % der ursprünglichen Konzentrationen. Die Transferrate schien sich ähnlich der für β -Carotin zu verhalten. Sie stieg von 37 auf 53 $\mu\text{g/ml}$ an bzw. fiel von 47 auf 11 $\mu\text{g/ml}$ ab.

Abb. 8: Cholesterin-Konzentration der Lipoproteine nach Inkubation des Rinderserums mit $0,6 \mu\text{g}$ β -Carotin/ml



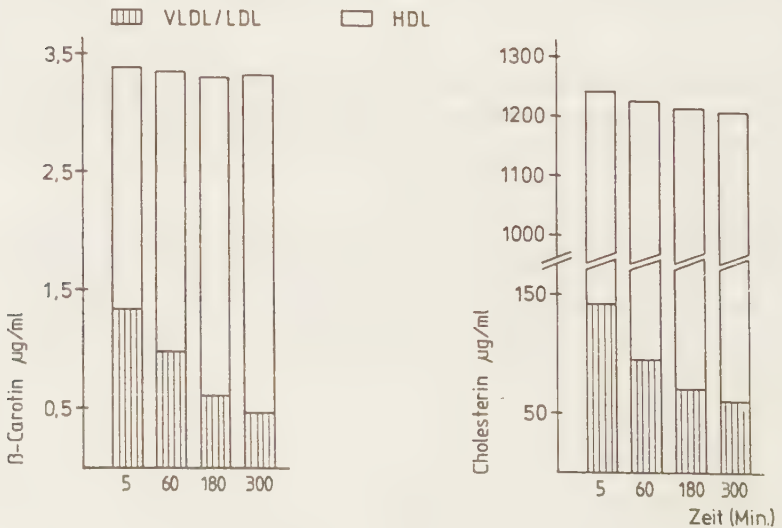
Zu beachten ist, daß durch die Vielzahl der Schritte bei der Gewinnung und Analyse der Lipoproteine die von VLDL/LDL auf HDL transferierten β -Carotin- und Cholesterinmengen nicht identisch waren.

Der VLDL/LDL-Proteingehalt lag konstant bei $0,3 \text{ mg/ml}$ Rinderserum. Damit ist der Lipidtransfer nicht auf einen Abbau oder eine Zerstörung der Apoproteine durch die Inkubationsbedingungen (Wärmezufuhr, mechanische Einwirkungen) zurückzuführen.

Tab. 8: β -Carotin- und Cholesteringehalte in den Lipoproteinen nach Zugabe von $1,5 \mu\text{g } \beta\text{-Carotin/ml}$

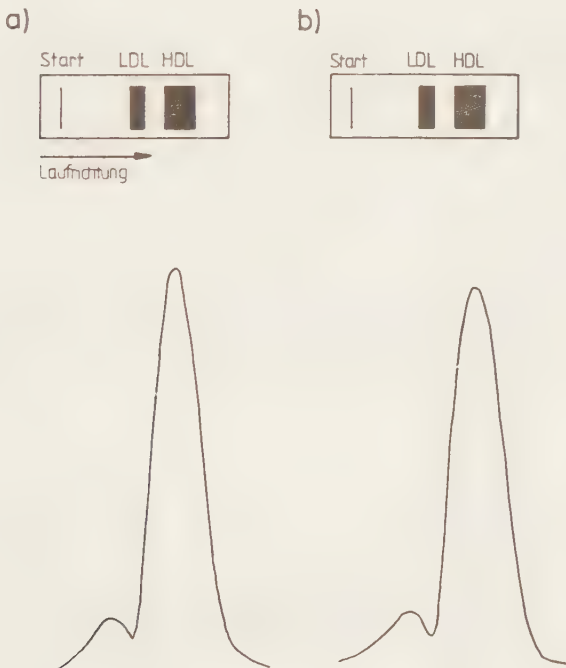
Zeit (Min)	5 leer	5 inkub.	60	180	300
<u>β-Carotin</u> $\mu\text{g/ml}$					
VLDL/LDL	0,29	1,36	0,98	0,61	0,47
HDL	1,63	2,06	2,36	2,64	2,85
<u>Cholesterin</u> $\mu\text{g/ml}$					
VLDL/LDL	141	143	96	72	61
HDL	1089	1098	1127	1139	1144

Abb. 9: β -Carotin- und Cholesterin-Gehalt der Lipoproteine nach Inkubation des Serums mit $1,5 \mu\text{g } \beta\text{-Carotin/ml}$



In der Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Elektrophorese und der densitometrischen Auswertung zu sehen. Die HDL- und LDL-Fraktionen sind deutlich getrennt. Erstere zeichnen sich durch ihre große Breite und intensiv dunkelblauschwarze Färbung aus. Die Banden mit β -Mobilität dagegen sind dem

Abb. 10: Elektrophorese und Densitometrie von unbehandeltem (a) und mit β -Carotin inkubiertem Rinderserum (b)

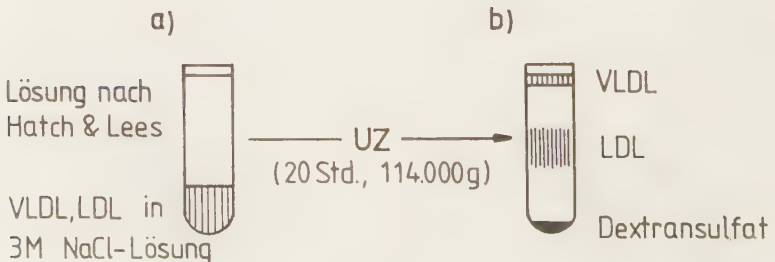


Auftragungsort näher sowie an ihrer geringeren Breite und Farbindensität erkenntlich. Eine Prä- β -Bande (VLDL) konnte bei keiner Probe nachgewiesen werden. Die relative Mobilität schwankte in sehr engen Grenzen zwischen 0,65 und 0,67.

Die densitometrische Auswertung bestätigte die Auftrennung in die Alpha- und β -Lipoproteinbanden. Die Ergebnisse nach 1 bis 5-stündiger Inkubation unterschieden sich nicht. Auf ihre Darstellung konnte daher verzichtet werden.

Bei der analytischen Ultrazentrifugation zeigte sich kein Unterschied zwischen der VLDL/LDL-Fraktion des unbehandelten und des mit β -Carotin inkubierten Rinderserums. Die LDL-Bande war 0,8 cm breit und in ihrem tiefsten Punkt 1,3 cm vom Boden des Ultrazentrifugenröhrchens entfernt. Die VLDL-Bande flotierte in einer Breite von 0,3 cm oben auf. Es wurde zwar keine quantitative Bestimmung des β -Carotin-Gehaltes durchgeführt, doch war bei den LDL-Banden des inkubierten Rinderserums eine deutlich intensivere Gelbfärbung erkennbar.

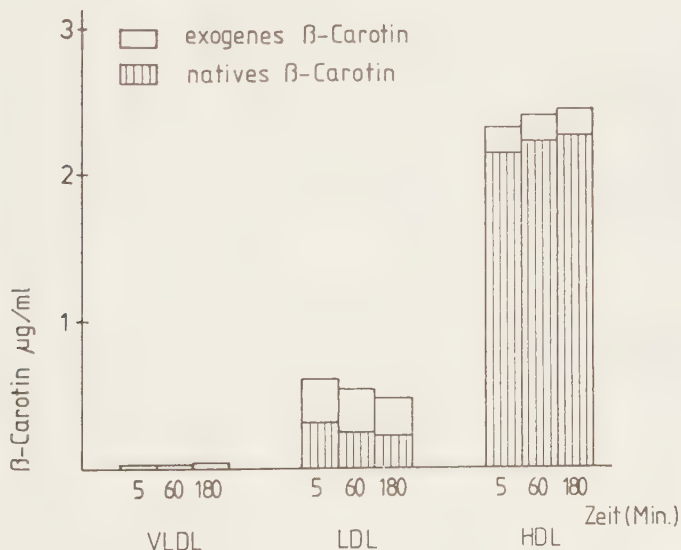
Abb. 11: Schichtung der Lipoproteine des inkubierten Rinderserums vor (a) und nach (b) der Ultrazentrifugation



4.2.2.2 Versuch VII: Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch gelöstem β -Carotin unter spezieller Betrachtung der VLDL-Fraktion

VLDL besitzt beim Rind mit 94 % den höchsten Lipidanteil. Aus diesem Grunde sollte die Bindungsfähigkeit von β -Carotin an diese Fraktion überprüft werden. VLDL wurde entsprechend Material und Methoden 3.3.1 und 3.3.2 gewonnen, mit einer Kanüle abgezogen und in einem Meßkolben mit 5 % NaCl-Lösung auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Die gleichzeitige Untersuchung der ausgefällten VLDL/LDL-Fraktion erlaubt über die Differenzbildung (VLDL/LDL minus VLDL) eine indirekte Bestimmung des β -Carotins, Cholesterins und Proteins im LDL.

Abb. 12: β -Carotin-Gehalt der Lipoproteine nach Inkubation des Serums mit $0,5 \mu\text{g } \beta\text{-Carotin/ml}$



Erwartungsgemäß war nach 5 Minuten mit 64 % der Großteil des zugegebenen β -Carotins an VLDL/LDL gebunden. War im Kontrollserum kein β -Carotin in der VLDL-Fraktion zu finden, so konnte nach der Inkubation eine Konzentration von 0,04 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Dies entspricht 8 % der zugegebenen Menge.

Tab. 9: Zeitlicher Verlauf der β -Carotin-, Cholesterin- und Proteinkonzentrationen in den Lipoproteinen nach der Zugabe von 0,50 μg äthanolisch gelöstem β -Carotin/ml

	Zeit (Min) 5		60		180	
	leer	inkub.	leer	inkub.	leer	inkub.
<u>β-Carotin</u> $\mu\text{g/ml}$						
VLDL	0,003	0,04	0,003	0,04	0,003	0,06
LDL	0,31	0,59	0,25	0,53	0,22	0,48
HDL	2,15	2,33	2,23	2,41	2,27	2,45
Überstand	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Summe	2,46	2,96	2,48	2,98	2,49	2,99
<u>Cholesterin</u> $\mu\text{g/ml}$						
VLDL	4	4	4	4	4	4
LDL	210	209	164	162	159	157
<u>Protein</u> mg/ml						
VLDL	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
LDL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
HDL	7,7	7,7	7,7	7,6	7,7	7,7

Während der folgenden 3 Stunden blieb die β -Carotin-Konzentration, wie auch die des Cholesterins, in dieser Fraktion zumindest konstant, während sie im LDL von 0,59 auf 0,48 $\mu\text{g/ml}$ abfiel. Überraschenderweise ist selbst nach der Zugabe von exogenem β -Carotin kein Nettotransport von VLDL/LDL auf HDL vorhanden. Der Nettotransport berechnet sich, indem das nach 1 und 3 Stunden von VLDL/LDL abgegebene β -Carotin der inkubierten Lipoproteine von dem der Leerwerte subtrahiert wird.

Die Proteinbestimmungen erhärten das Ergebnis des Versuches VI, da weder VLDL (5 $\mu\text{g/ml}$) noch LDL (10,5 mg/ml) und HDL (7,7 mg/ml) Verluste aufwiesen.

4.2.2.3 Versuch VIII: Inkubation von Rinderserum mit äthanolisch gelöstem, radioaktivem β -Carotin und Einsatz an Zellkulturen

In einem Vorversuch konnte nachgewiesen werden, daß sich ^{14}C -markiertes und kaltes β -Carotin in ihrer Bindungsfähigkeit an die Lipoproteinfraktionen nicht unterschieden. Nach 5 Minuten waren 68 % des radioaktiven β -Carotins an VLDL/LDL gebunden. 25 % fanden sich im HDL wieder und knapp 7 % im Überstand. Das markierte β -Carotin wurde freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt.

Auch bei der Agarosegelelektrophorese waren keine Abweichungen vorhanden. Deutlich konnten die Alpha- und β -Lipoproteinbanden voneinander getrennt werden. Der Mobilitätsindex betrug 0,65.

Der als Vergleich durchgeführte Einsatz von β -Carotin an Zellkulturen zeigte, daß während der sechsständigen Inkubation mit LDL-gebundenem β -Carotin keine Bindung an die Membran oder Aufnahme in die Zelle erfolgte. Hingegen war beim äthanolisch angebotenen β -Carotin eine stetige Zunahme der Radioaktivität von 61 auf 440 cpm, bezogen auf 1 mg Zellprotein, zu verzeichnen.

Tab. 10: Inkubation der Fibroblasten-Zellkultur mit Lipoprotein gebundenem (LP-geb.) bzw. äthanolisch gelöstem (gelöst.), radioaktiv markiertem β -Carotin

Zeit (Min)	30		120		360	
β -Carotin ¹ cpm/Probe	LP-geb.	gelöst	LP-geb.	gelöst	LP-geb.	gelöst
Inkubation	13800	27720	13800	27720	13800	27720
ungebunden	13689	27868	13550	27692	13542	26803
gebunden/ mg Zellprot.	0	61	0	200	0	440
% Wieder- findung	99.2	100.8	98.2	100.6	98.1	98.3

1) Der LDL-gebundene Cholesteringehalt betrug 0,4 mg/Ansatz

5 DISKUSSION

5.1 Methodik

5.1.1 Rekombination von β -Lipoproteinen mit β -Carotin

β -Carotin und Cholesterin konnten mit Heptan vollständig aus den Lipoproteinen extrahiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit GUSTAFSON (1964) und KRIEGER (1987) überein.

Dabei scheint Cholesterin leichter entfernt zu werden als β -Carotin. Während KRIEGER et al. (1978) mit der ersten Extraktion 99 % des Gesamtcholesterins lösten, erwies sich in den vorliegenden Versuchen bei β -Carotin eine dreimalige Extraktion als notwendig. Dies könnte durch andersgelagerte Bindungsverhältnisse, die auf den hohen Anteil an Doppelbindungen im β -Carotin-Molekül zurückzuführen sind, sowie Unterschiede im Löslichkeitsverhalten in Heptan erklärt werden. Möglicherweise erschwert auch die um -10°C auf -20°C erniedrigte Extraktionstemperatur das Aufbrechen bestehender Bindungen.

Die Rekombinationsraten für β -Carotin lagen zwischen 10 und 26 %, wenn es dem Apoprotein allein angeboten wurde. Im Gegensatz dazu fanden CHEN et al. (1980) bei humanem LDL nur zwischen 2 und 7 %. Bei dieser Untersuchung wurde β -Carotin aber in Carbondotetrachlorid, das schlechtere Rekombinationsraten aufweist, gelöst und zusammen mit Cholesterin oder Triolein zugeführt. Zudem betrug die Inkubationszeit statt 41 nur 14 Stunden. Auch wurden bis zum 200-fachen höhere Lipidkonzentrationen eingesetzt. Dies ist zu berücksichtigen, da mit zunehmendem Lipidangebot die relativen Bindungs-
raten sinken.

Der bessere Rekombinationserfolg durch den beschriebenen Einsatz von Ultraschall kann auf folgenden physikalischen Prinzipien beruhen: Erstens wird die Interaktion zwischen dem Protein und dem Lipid beschleunigt (RITTER & SCANU, 1977). Zum Zweiten tragen durch den Ultraschall entstandene Radikale zur Rekombination bei (SCANU et al., 1970). Drittens werden die an die Stärke und zum Teil an die Glaswand gebundenen Lipoproteine schneller und gleichmäßiger in Tricin-Puffer gelöst und deswegen mit geringeren Verlusten zurückgewonnen.

Die Behandlung mit Ultraschall führte bei Versuchen von SATO et al. (1971) zu Veränderungen der Agargelpräzipitation. RITTER & SCANU (1979) dagegen fanden keinen Einfluß auf das Apoprotein. Dies konnte bei den eigenen Untersuchungen durch die Ausfällung der rekombinierten Lipoproteine mit Dextransulfat bestätigt werden.

Mit 45 % waren die Bindungsraten am höchsten, wenn β -Carotin zusammen mit den extrahierten Lipiden angeboten wurde. Dadurch scheinen sich dieselben oder ähnliche Bindungen zwischen β -Carotin und dem Apoprotein bzw. den anderen Lipiden aufzubauen wie sie in nativen Lipoproteinen zu finden sind. Diese Wechselwirkungen dürften auch die Ursache dafür sein, daß der Einbau der Triglyceride und des Gesamtcholesterins durch β -Carotin deutlich erhöht wurde.

Während die Wiederfindung des Gesamtcholesterins der von β -Carotin glich, wurden die Triglyceride vermehrt gebunden. Bei letzteren fehlen allerdings Analysen über das Extraktionsverhalten, so daß die tatsächliche Rekombinationsrate niedriger liegen könnte.

Die Bestimmung des nach der Rekombination wiedergefundenen

Proteins ermöglicht die zuverlässigste Aussage über die Qualität der Methode. Die Ergebnisse schwanken trotz der sehr aufwendigen Technik in relativ engen Grenzen zwischen 60 und 72 %. Erwartungsgemäß waren die geringsten Verluste (ca. 22 %) zu finden, wenn auf die Extraktion verzichtet wurde. Ähnlich geringe Verluste, vor allem bei Rekombinationsstudien mit langkettigen, ungesättigten Cholesterinestern, fanden KRIEGER et al. (1979). Dagegen wiesen CHEN et al. (1980) darauf hin, daß β -Carotin die extrahierten Kernlipide nicht vollständig ersetzen kann. Sie fanden deshalb nur 0,18 mg lösliches LDL-Protein.

Das bovine Apoprotein konnte durch die Zugabe von bis zu 30 μ g β -Carotin nicht gesättigt werden. Eine Erhöhung der angebotenen Menge hatte immer auch eine Zunahme des absoluten β -Carotin-Gehaltes im Apoprotein zur Folge. Die ursprünglichen β -Carotin-Konzentrationen wurden dabei sogar überschritten. CHEN et al. (1980) bestätigen diese Beobachtung, da sie in nativem LDL maximal 2 μ g, in rekombiniertem LDL jedoch bis zu 55 μ g β -Carotin fanden.

Eine Abhängigkeit des rekombinierten Proteingehaltes von der zugegebenen Menge an β -Carotin und damit eine Sättigung des β -Carotin/Protein-Gewichtsverhältnisses scheint nicht gegeben. Bei relativ konstanten Proteingehalten bedeutet eine steigende Bindung von β -Carotin an die Lipoproteine auch eine stetige Zunahme des β -Carotin/Protein-Quotienten. Lediglich die Versuche I und IV (Methode A) könnten auf eine Abhängigkeit hindeuten, doch schränken der hohe Leerwert und zu niedrige Probenzahlen diese Überlegungen ein. KRIEGER et al. (1978) hingegen beschrieben eine derartige Abhängigkeit bei Untersuchungen mit Cholesterinestern. Die Erhöhung der angebotenen Lipidmenge bis zum Faktor 1000 könnte eine Sättigung des Apoproteins erleichtert haben.

Mit 70 % ist die Wiederfindung des Apoproteins bei den Proben, die nach der Extraktion nicht rekombiniert wurden, sehr hoch. Dies stimmt mit Ergebnissen von AVIGNAN (1957) überein, dessen Apoprotein-Phospholipid-Komplex nach der Extraktion in Lösung blieb und lediglich eine höhere Dichte aufwies. GUSTAFSON (1964) und KRIEGER et al. (1978) beziffern die Löslichkeit des Apoprotein B jedoch nur auf 10 bis 20 %.

Verschiedene Gründe können diese hohe Wiederfindungsrate bedingen: Erstens scheint es möglich, daß die Lipoproteine durch die Ausfällung mit Dextransulfat Strukturveränderungen erfahren haben. Diese Annahme als richtig vorausgesetzt, müßten sowohl die Leerwerte als auch die Werte der mit β -Carotin rekombinierten Apoproteine verändert sein. Der Vergleich der Werte untereinander wäre jedoch nicht betroffen, da bei allen Proben dieselbe Menge Dextransulfat verwendet wurde. Zweitens wurde der Proteinverlust durch den Verzicht auf eine Zentrifugation der in Tricin-Puffer gelösten Lipoproteine verringert. KRIEGER et al. (1978) beziffern ihn auf 10 - 15 %. Zum Dritten können niedrigere Extraktionstemperaturen (-20°C) und die Begasung der Proben mit Stickstoff eine Schonung des Proteins bewirkt haben. FISHER & SCHUMAKER (1987) halten das Apoprotein B selbst im gefrorenen Zustand für einen äußerst sensiblen Proteinbestandteil, der zudem nach der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zur Aggregatbildung, aber auch zur Dissoziation in kleinere Polypeptide neigt. Als Letztes müssen noch Unterschiede in der Zusammensetzung boviner und humaner LDL sowie das Extraktionsverhalten der Lipide in Betracht gezogen werden. Besonders die Phospholipide mit ihren ungesättigten Fettsäuren zeigten mit 1,5 und 45 % bei GUSTAFSON (1964) und KRIEGER et al. (1978) erhebliche Unterschiede bei der Extraktion. Als amphiphile Liganden aber sind sie für die Wasserlöslichkeit des Apoproteins verantwortlich (STEELE & REYNOLDS, 1979).

Zusammenfassend können aus den Rekombinationsstudien mit β -Carotin folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. β -Carotin kann mit dem Apoprotein in Konzentrationen rekombiniert werden, die denen von nativem LDL entsprechen.
2. Der Einbau von β -Carotin in das Apoprotein ist vom Zustand des Proteins (gelöst - ausgefällt, extrahiert - nicht extrahiert) sowie von der Art, β -Carotin anzubieten (allein-mit anderen Lipiden), abhängig.
3. Der Prozeß der Einlagerung dürfte energieunabhängig sein. Durch Ultraschallung kann die Rekombinationsrate aber erhöht werden.

5.1.2 Inkubation von Rinder Serum mit β -Carotin

Der β -Carotin-Gehalt von VLDL/LDL schwankte beim nativen Rinder Serum zwischen 11,4 und 17,9 %. Dies entspricht den von SCHWEIGERT et al. (1987) gefundenen Ergebnissen für das laktierende Rind.

Lipoproteine sind bekanntlich in der Lage, auch nach ihrer Bildung lipophile Substanzen aufzunehmen. Ein Austausch lipophiler Bestandteile wie Cholesterin, Phospholipide und Tocopherol findet in-vitro und in-vivo statt (KUNKEL & BEARN, 1954; EISENBERG & LEVY, 1975; BJORNSEN et al., 1976). Die Bindung großer Mengen von Phospholipiden und Cholesterin in-vitro durch bovines HDL wurde von JONAS (1979) beschrieben. Demnach wäre die Bindung von β -Carotin in-vitro nicht ungewöhnlich.

Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Aufnahme ungelöster Lipide vom Vorkommen bestimmter Transferproteine im Plasma abhängig ist. So wird der Einbau von Cholesterinestern in die Lipoproteine bei Ratte, Affe und Mensch von einem Cholesterinester-Transferprotein katalysiert (THOMAS & RUDEL, 1983; FIELDING & FIELDING, 1980). Die negativen Ergebnisse mit ungelöstem, an die Glaswand adsorbierten β -Carotin (Versuch V) sprechen möglicherweise gegen die Existenz eines β -Carotin transferierenden Proteins. Falls es sich jedoch um ein Protein mit Enzymcharakter handelt, könnte es durch die Zugabe von EDTA, wie dies in den Serumproben der Fall war, gehemmt sein.

Äthanolisch gelöstes, kaltes und radioaktiv markiertes β -Carotin wurde dagegen beinahe vollständig an die Lipoproteinfraktionen gebunden. Entsprechend den lipophilen Eigenschaften entfielen zwischen 64 und 81 % auf VLDL/LDL. An HDL banden sich 19 - 36 %, obwohl dies die quantitativ bedeutendste Fraktion darstellt. Den größten Aufschluß über die Bindungskapazität der Lipoproteine erhält man, wenn der Anstieg der β -Carotin-Menge in den einzelnen Fraktionen auf die Ausgangsmenge vor der Inkubation bezogen wird. Wie aus Versuch VII zu entnehmen, war der Anstieg bei VLDL mit über 1200 % am größten, gefolgt von LDL mit 90 % und HDL mit nur 8 %. In der Tendenz ähnliche Ergebnisse, wenn auch mit wesentlich niedrigeren Zuwachsraten, fand EISELE (1987). Die Unterschiede liegen darin begründet, daß die β -Carotin-Emulsion nur zu 2 % an die Lipoproteine angelagert wurde, während sich bei den eigenen Versuchen das äthanolisch gelöste β -Carotin fast vollständig an die Lipoproteine band.

Die Ursachen des mit 17 Prozentpunkten relativ hohen Schwankungsbereichs für VLDL/LDL-gebundenes, exogenes β -Carotin sind nicht bekannt. Es scheint weder eine Abhängigkeit vom Gehalt an β -Carotin, Cholesterin und Protein in den nativen Lipoproteinen noch von den exogenen β -Carotin-Gaben zu bestehen. Wegen der Apolarität des β -Carotin-Moleküls könnte, eine unspezifische Bindung an die Lipoproteine vorausgesetzt, deren Gehalt an Neutralfetten von Bedeutung sein. Die Aufnahme von Lipiden ist von ihrer Affinität zu den Lipoproteinbestandteilen abhängig (JONAS, 1979).

Nativ gebundenes und exogenes β -Carotin wurden von VLDL/LDL auf HDL übertragen. Möglicherweise erfährt die VLDL/LDL-Fraktion anfangs eine Sättigung ihrer Transportkapazität. Im Laufe der Zeit findet eine Verschiebung zugunsten von HDL statt. Danach ist zwar der Absolutwert in den Lipoproteinen erhöht, doch wird die ursprünglich im eingesetzten Rinderserum vorhandene prozentuale Verteilung annähernd erreicht.

Als Folge schwächerer Bindungsmöglichkeiten an VLDL/LDL scheint äthanolisch gelöstes β -Carotin in wesentlich höheren Konzentrationen transferiert zu werden als in-vivo gebundenes (Tab. 11). Dabei könnte eine Abhängigkeit von der gebundenen, exogenen β -Carotin-Konzentration bestehen. Je mehr β -Carotin nach 5 Minuten an VLDL/LDL gebunden war, desto größer waren die Transferraten am Anfang.

Tab. 11: Überblick über das von den Lipoproteinen abgegebene (-) bzw. aufgenommene (+) β -Carotin ($\mu\text{g/ml}$) während der 3-5 stündigen Inkubation bei den Versuchen VI und VII

Zeit (Min)	5	60	180	300
<u>VERSUCH VI (Tab. 7)</u>				
VLDL/LDL	+ 0,52	- 0,05 (- 0,02)	- 0,15 (- 0,01)	- 0,23 (- 0,08)
HDL	+ 0,12	+ 0,05 (0,0)	+ 0,16 (+ 0,02)	+ 0,22 (+ 0,06)
<u>VERSUCH VI (Tab. 8)</u>				
VLDL/LDL	+ 1,07	- 0,38	- 0,37	- 0,14
HDL	+ 0,43	+ 0,30	+ 0,28	+ 0,21
<u>VERSUCH VII (Tab. 9)</u>				
VLDL	+ 0,04	0,0 (0,0)	+ 0,02 (0,0)	
LDL	+ 0,28	- 0,06 (- 0,06)	- 0,05 (- 0,03)	
HDL	+ 0,18	+ 0,08 (+ 0,08)	+ 0,04 (+ 0,04)	

1) In Klammern ist die übertragene β -Carotin-Menge der Leerwerte angegeben

Auch nativ vorhandenes Cholesterin wurde von VLDL/LDL auf HDL transferiert, jedoch in wesentlich größeren Mengen als β -Carotin. Die Übertragung zeigte sich unabhängig vom β -Carotin und konnte auch durch dessen exogene Zufuhr nicht gesteigert werden. Umgekehrt könnte aber der β -Carotin-Transfer von Cholesterin abhängig sein. Die Übertragung von Cholesterin erfolgt wahrscheinlich über ein Glykoprotein (PATTHAIK et al., 1978) und führt zur Zunahme des Durchmessers und der Oberfläche von HDL. Dieser Vorgang wird durch das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase unterstützt, da es Fettsäuren, z.B. Linoleinsäure, auf HDL gebundenes Cholesterin transferiert. Die Fettsäuren könnten dazu an Albumin gebunden werden (FREDRICKSON & GORDON, 1958). Als Folge dieser Oberflächenvergrößerung stellten ASHES et al. (1984) einen verstärkten Einbau von β -Carotin im HDL fest.

Die Auftrennung der Lipoprotein-Fraktionen (Versuch VII) macht deutlich, daß der Rückgang des β -Carotins in der VLDL/LDL- letztlich auf eine Abnahme in der LDL-Fraktion zurückzuführen ist. Folgende Transferwege sind nach GOTTO et al. (1987) möglich: 1) Der Austausch oberflächennaher Lipide durch Kollision der Lipoproteine 2) Die Lösung vornehmlich polarer Lipide im wässrigen Medium, um sich beim nächsten Kontakt mit einem Lipoprotein an dieses zu binden 3) Der Transfer spezifischer Lipide, z.B. Cholesterinester, über Proteine. Eine Übertragung durch Lipoproteinbruchstücke kann wegen der konstanten Proteinwerte sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Die physikalischen Eigenschaften der Lipoproteine, die mit äthanolisch gelöstem β -Carotin inkubiert wurden, scheinen unverändert. Dagegen könnte die Verfügbarkeit der LDL-Fraktion an Zellkulturen eingeschränkt sein. Dies steht im Wi-

derspruch zu THELLMAN & SHIREMAN (1985). Zudem bedarf es zur endgültigen Beurteilung wegen der Einmaligkeit des Versuches mit Zellkulturen weiterer Untersuchungen.

Die fehlende Interaktion zwischen Lipoprotein und Rezeptor kann auf einer Reihe von Ursachen beruhen. Möglicherweise treten durch die Methodik der Lipoproteingewinnung und -markierung molekulare Veränderungen am LDL-Molekül auf, die zwar die biologischen, nicht aber die physikalischen Eigenschaften beeinflussen. GOTTO et al. (1987) deuteten an, daß die Ausfällung von Lipoproteinen strukturelle und biologische Besonderheiten gefährdet. Zudem könnte Äthanol, ähnlich wie Hexandion, eine Veränderung der argininreichen Strukturen des Apoproteins bewirken. Diese sind für die Erkennung bzw. Anheftung an den Rezeptor notwendig (MAHLEY et al., 1977).

Außerdem könnten andere Zellsysteme als Fibroblasten für Untersuchungen mit β -Carotin geeigneter sein. Sie besitzen zwar Rezeptoren für LDL, doch könnte ihre Anzahl wegen des relativ geringen Cholesterinbedarfs zu gering sein. Da der β -Carotin-Gehalt der Lipoproteine wesentlich niedriger ist als der Cholesteringehalt, erscheint es sinnvoll, Versuche mit Zelllinien zu wiederholen, die auf eine hohe Cholesterinversorgung angewiesen sind und damit auch an Lipoproteine gebundenes β -Carotin verstärkt aufnehmen. Wegen der vermehrten Anreicherung in der Zelle würde der Nachweis für β -Carotin wesentlich erleichtert. Als besonders geeignet erscheinen Nebennierenrinden- und Corpus luteum-Zellen.

Darüber hinaus könnten artspezifische Eigenheiten für eine fehlende Wechselwirkung zwischen bovinen β -Lipoproteinen und humanen Fibroblasten verantwortlich sein. BROWN & GOLDSTEIN (1985) meinen jedoch, daß für die Erkennung der Rezeptorstelle und die Bindung an diese ausschließlich Apoprotein B, der

wesentliche Proteinbestandteil im LDL-Molekül, zuständig ist. Untersuchungen mit humanen, bovinen und porcinen Lipoproteinen an Zellen des Rindes und Schweines erhärten diese These (KOVANEN et al., 1979a; VELDHUIS et al., 1985).

Weiterhin sind die chemischen Bedingungen, unter denen die Inkubation der Fibroblasten stattfand, zu berücksichtigen. Unklar ist, ob die zweiwertigen Kationen, die für die Bindung zwischen Apoprotein und Rezeptor essentiell sind, im Kulturmedium ausreichend zur Verfügung standen. Aus diesem Grunde müssen auch mögliche Kationenfänger, z.B. EDTA oder bestimmte Serumproteine, in Betracht gezogen werden.

Die Beobachtung, daß organisch gelöstes, nicht-lipoprotein gebundenes β -Carotin von Zellen aufgenommen wird, wurde bereits von SOM et al. (1984) gemacht. Die Aufnahme erfolgt entweder auf dem Weg der Pinozytose oder über Zellkanäle. Der Transfer findet solange statt wie ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Zellkulturmedium und dem Zellinnern besteht.

5.2 Bedeutung der mit β -Carotin beladenen Lipoproteine für den Einsatz in Zellkulturen und in-vivo

Zellen benötigen LDL-gebundenes Cholesterin für die Synthese ihrer Membranen (siehe Literatur 2.2.2.1). Tumorzellen haben wegen ihres beschleunigten Wachstums einen stark erhöhten Cholesterinbedarf. Deshalb zeigen Tumorzellen einen größeren LDL-Bedarf und höhere Rezeptoraktivitäten.

Das dringendste Problem bei der Chemotherapie von Tumoren ist die mangelnde Selektivität der cytotoxischen Substanzen, da auch gesunde Zellen zerstört werden. Untersuchungen wurden durchgeführt, die eine gezieltere Tumorthherapie ermöglichen sollten. Jedoch verliefen in-vivo Versuche mit an Liposomen gebundenen Cytotoxinen wegen der Labilität der Vesikel und des raschen Abbaus durch Zellen des retikuloendothelialen Systems unbefriedigend (GREGORIADES et al., 1974).

In neuesten Untersuchungen wurde LDL als Carrier der cytotoxischen Agentien verwendet (LUNDBERG, 1987). Das mit Carbamat rekombinierte Lipoprotein unterschied sich in der Struktur und der zellulären Aufnahme kaum von nativem LDL. Sein Einsatz an tumorös entarteten Fibroblasten führte zum Absterben der Tumorzellen.

Auf dieser Grundlage könnte der LDL-gebundene Einsatz von β -Carotin bei der Prophylaxe, vielleicht auch der Therapie von Tumoren, bedeutungsvoll sein. Besonders wegen der Eigenschaften als Radikalfänger und der Stimulierung des Immunsystems sowie wegen der fehlenden Nebenwirkungen, im Gegensatz zu Vitamin A, scheint β -Carotin interessant.

Zudem brauchen die Lipoproteine bei der sehr einfachen Methode, β -Carotin in Äthanol direkt an diese zu binden, nicht mehr extrahiert zu werden. Die Extraktion stellte sich als kritisch heraus, da bereits geringste Strukturveränderungen des Apoproteins einen Angriff der Retikuloendothelialzellen auslösen (LUNDBERG, 1987).

5.3 Schlußfolgerung

Unter Berücksichtigung des Zeitaufwandes, der benötigt wird, um β -Carotin an Lipoproteine zu binden, sowie der Effizienz ist die Methode von BARTER & JONES (1980) als die geeignetste anzusehen.

Die drei Lipoproteinfractionen (VLDL, LDL, HDL) können in kürzester Zeit mit exogenem, markiertem oder unmarkiertem β -Carotin beladen werden. Durch die Manipulation werden die physikalischen Eigenschaften der Lipoproteine nicht verändert, die Beurteilung des biologischen Verhaltens ist noch offen.

Auch im Hinblick auf den Umgang mit radioaktivem Material erwies sich diese Methode als überlegen. Die Kürze der Manipulation sowie der geringe Abfall von unbrauchbarem, radioaktiv belastetem Material sind sehr vorteilhaft.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Exogenes β -Carotin wurde mit Hilfe verschiedener Methoden an extrahierte Lipoproteine (Apo-LDL) oder native Lipoproteine gebunden.

Die apolaren Kernbestandteile isolierter, boviner LDL wurden nach Dialyse und Lyophilisation mit Heptan extrahiert. Die Rekombination von Apo-LDL erfolgte mit β -Carotin allein oder zusammen mit dem apolaren Extrakt. Bei der Rekombination nur mit β -Carotin wurden nahezu 26 % der angebotenen Menge an Apo-LDL gebunden. Die Zugabe vom apolaren Extrakt steigerte die Rekombinationsrate auf 45 %.

Während ungelöstes β -Carotin weder in das Serum noch in die Lipoproteine transferierte, band sich in Äthanol gelöstes β -Carotin an native, bovine Lipoproteine. Nach 5-minütiger Inkubation wurden bis zu 96 % des angebotenen, markierten oder unmarkierten β -Carotins an die Lipoproteine gebunden. Davon fanden sich zwischen 64 und 81 % in der VLDL/LDL-Fraktion wieder. Mit zunehmender Inkubationszeit veränderte sich die Verteilung auf die Lipoproteine durch eine Abnahme in der LDL- und eine Zunahme in der HDL-Fraktion. Nativ gebundenes Cholesterin zeigte ein ähnliches Verhalten.

Mit β -Carotin beladene Lipoproteine wiesen bei der selektiven Präzipitation, der Ultrazentrifugation und der Elektrophorese keine Unterschiede zu nativen Lipoproteinen auf.

SUMMARY

METHODS TO BIND EXOGENOUS β -CAROTENE TO LIPOPROTEINS

The binding of exogenous β -carotene to extracted lipoproteins (Apo-LDL) or native lipoproteins was tested with different methods.

The apolar components of bovine LDL were removed by heptane after dialysis and lyophilization. For recombination of Apo-LDL, β -carotene with or without the apolar extract was used. When β -carotene was added without the apolar extract, approximately 26 % of the exogenous β -carotene was bound to Apo-LDL. In combination with the apolar extract, however, this rate could be increased to 45 %.

While crystalline β -carotene was transferred neither to serum nor to lipoproteins, the solubilization of β -carotene in ethanol resulted in the binding of β -carotene to native, bovine lipoproteins. After 5 minutes of incubation, up to 96 % of the added, labeled or unlabeled β -carotene was bound to lipoproteins. Between 64 and 81 % were recovered in the VLDL/LDL-fraction. During the incubation the distribution of β -carotene in the lipoproteins changed by a decrease in the LDL- and an increase in the HDL-fraction. A similar behaviour was found for natively bound cholesterol.

Lipoproteins loaded with exogenous β -carotene were no different than native lipoproteins in selective precipitation, ultracentrifugation and electrophoretic mobility.

LITERATURVERZEICHNIS

- AKORDOR, F.Y., J.B. STONE, J.S. WALTON, K.E. LESLIE and J.G. BUCHANAN-SMITH (1986)
Reproductive performance of lactating Holstein cows fed supplemental β -carotene
J. Dairy Sci. 69, 2173-2178
- ALAM, S.Q. and B.S. ALAM (1983)
Chemopreventive effects of β -carotene and 13-cis-retinoic acid on salivary gland tumors
Fed. Proc. 42, 1313
- ARBEITER, K., E. KNAUS und M. THURNHER (1983)
Repetitionstest über die Genitalfunktionen von Rindern in Abhängigkeit vom β -Carotengehalt im Blut
Zbl. Vet. Med. A. 30, 206-213
- ASHES, J.R., R.W. BURLEY, G.S. SIDHU and R.W. SLEIGH (1984)
Effect of particle size and lipid composition of bovine blood high density lipoprotein on its function as a carrier of β -carotene
Biochim. Biophysic. Acta 797, 171-177
- AVIGNAN, J. (1957)
Modification of human serum lipoprotein fractions by lipid extraction
J. Biol. Chem. 226, 957-964
- BAUCHART, D. et D. LEVIEUX (1985)
Lipoprotéines plasmatiques du veau préruminant
Reprod. Nutr. Dévelop. 25, 243-250
- BARTER, P.J. and M.E. JONES (1980)
Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins
J. Lipid Res. 21, 238-249
- BJORNSON, L.K., H.J. KAJDEN, E. MILLER and A.N. MOSHELL (1976)
The transport of α -tocopherol and β -carotene in human blood
J. Lipid Res. 17, 345-352
- BONSEMBIANTE, M., I. ANDRIGHETTO e G. BITTANTE (1983a)
Beta-carotene e fertilità bovina. Ulteriori risultati sperimentali
Zoot. Nutr. Anim. 9, 199-212

- BONSEMBIANTE, M., I. ANDRIGHETTO e G. BITTANTE (1983b)
Effetto del beta-carotene sulla gravidanza e sul parto di
manze da carne e sull'allevamento dei vitelli ottenuti
in confinamento
Zoot. Nutr. Anim. 9, 401-417
- BROWN, M.S., P.T. KOVANEN and J.L. GOLDSTEIN (1980)
Evolution of the LDL receptor concept - from cultured
cells to intact animals
Ann. N.Y. Acad. Sci. 348, 48-68
- BROWN, M.S. and J.L. GOLDSTEIN (1976)
Receptor-mediated control of cholesterol metabolism
Science 191, 150-154
- BROWN, M.S. und J.L. GOLDSTEIN (1985)
Arteriosklerose und Cholesterin: die Rolle der
LDL-Rezeptoren
Spektrum der Wissenschaft 1, 96-109
- BURDON, R.H. and P.H. VAN KNIPPENBERG (1984)
aus "Laboratory techniques in biochemistry and molecular
biology", Volume 14
Elsevier Amsterdam - New York - Oxford
- BURSTEIN, M. and H.R. SCHOLNICK (1973)
Lipoprotein-polyanion-metal interactions
Adv. Lipid Res. 11, 67-108
- BURTON, G.W. and K.U. INGOLD (1984)
 β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant
Science 224, 569-573
- CHAM, B.E. and B.R. KNOWLES (1976)
In vitro partial relipidation of apolipoproteins in plasma
J. Biol. Chem. 251, 6367-6371
- CHEN, G.C., M. KRIEGER, J.P. KANE, C.C. WU, M.S. BROWN and
J.L. GOLDSTEIN (1980)
 β -carotene as a probe of lipid domains of reconstituted
human plasma low-density lipoprotein: Induced circular
dichroism
Biochemistry 19, 4706-4712
- CHEW, B.P., D.M. HOLPUCH and J.V. O'FALLON (1984)
Vitamin A and β -carotene in bovine and porcine plasma,
liver, corpora lutea, and follicular fluid
J. Dairy Sci. 67, 1316-1322
- COLACCHIO, T.A. and V.A. MEMOLI (1986)
Chemoprevention of colorectal neoplasms
Arch. Surg. 121, 1421-1424

- CRAIG, I.F., D.P. VIA, B.C. SHERRILL, L.A. SKLAR, W.W. MANTULIN
A.M. GOTTO, Jr., and L.C. SMITH (1982)
Incorporation of defined cholesteryl esters into lipoproteins using cholesteryl ester-rich microemulsions
J. Biol. Chem. 257, 330-335
- DECKELBAUM, R.J., G.G. SHIPLEY and D.M. SMALL (1977)
Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins
J. Biol. Chem. 252, 744-754
- DUCKER, M.J., N.H. YARROW, G.A. BLOOMFIELD and J.D. EDWARDS-WEBB (1984)
The effect of β -carotene on the fertility of dairy heifers receiving maize silage
Anim. Prod. 39, 9-16
- EISELE, W. (1987)
 β -Carotin und Vitamin A in Blut und Milch des Rindes nach parenteraler und oraler Applikation von β -Carotin
Vet. Med. Diss., Universität München
- EISENBERG, S. and R.L. LEVY (1975)
Lipoprotein metabolism
Adv. Lipid Res. 13, 1-89
- EPSTEIN, J.H. (1977)
Effects of β -carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin
Photochem. Photobiol. 25, 211-213
- FAUST, J.R., J.L. GOLDSTEIN and M.S. BROWN (1977)
Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells
J. Biol. Chem. 252, 4861-4871
- FERRERI, L.F. and R.C. ELBEIN (1982)
Fractionation of plasma triglyceride-rich lipoproteins of the dairy cow: evidence of chylomicron-size particles
J. Dairy Sci. 65, 1912-1920
- FIELDING, P.E. and C.J. FIELDING (1980)
A cholesteryl ester transfer complex in human plasma
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 3327-3330
- FISHER, W.R. and V. N. SCHUMAKER (1987)
Isolation and characterization of apolipoprotein B-100
Methods Enzymol. 128, 247-262

- FREDRICKSON, D.S. and R.S. GORDON, JR. (1958)
Transport of fatty acids
Physiol. Rev. 38, 585-630
- FOLMAN, Y., I. ASCARELLI, Z. HERZ, M. ROSENBERG, M. DAVIDSON
and A. HALEVI (1979)
Fertility of dairy heifers given a commercial diet free
of β -carotene
Br. J. Nutr. 41, 353-359
- FOLMAN, Y., M. ROSENBERG, I. ASCARELLI, M. KAIM and
Z. HERZ (1983)
The effect of dietary and climatic factors on fertility,
and on plasma progesterone and oestradiol-17 β levels
in dairy cows
J. Steroid Biochem. 19, 863-868
- GANGULY, J., S. KRISHNAMURTY and S. MAHADEVAN (1959)
The transport of carotenoids, vitamin A and cholesterol
across the intestines of rats and chickens
Biochem. J. 71, 756-762
- GIANTURCO, S.H., K.-Y. HONG, M.R. STEINER, R.L. TAUNTON,
R.L. JACKSON, A.M. GOTTO, Jr., and L.C. SMITH (1979)
A laser spectrofluorimeter for studies of cultured cells
on the growth surface
Anal. Biochem. 92, 74-81
- GINSBURG, G.S., M.T. WALSH, D.M. SMALL and D. ATKINSON (1984)
Reassembled plasma low density lipoproteins
J. Biol. Chem. 259, 6667-6673
- GOLDSTEIN, J.L., S.K. BASU, G.Y. BRUNSCHEDÉ and M.S. BROWN (1976)
Release of low density lipoprotein from its cell surface
receptor by sulfated glycosaminoglycans
Cell 7, 85-95
- GOLDSTEIN, J.L. and M.S. BROWN (1977)
The low-density lipoprotein pathway and its relation to
atherosclerosis
Ann. Rev. Biochem. 46, 897-930
- GOTTO, A.M., H.J. POWNALL and R.J. HAVEL (1987)
Introduction to the plasma lipoproteins
Methods Enzymol. 128, 3-44
- GREGORIADES, G., E.J. WILLS, C.P. SWAIN and A.S. TAVILL (1974)
Drugcarrier potential of liposomes in cancer chemotherapy
Lancet 1, 1313-1316

- GUSTAFSON, A. (1964)
A new method for partial delipidization of serum lipoproteins
Biochim. Biophys. Acta 84, 223-225
- HATCH, F.T. and R.S. LEES (1968)
Practical methods for plasma lipoprotein analysis
Adv. Lipid Res. 6, 1-68
- HAVEL, R.J., J.P. KANE and M.L. KASHYAP (1973)
Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man
J.Clin. Invest. 52, 32-38
- HELENIUS, A. and K. SIMONS (1971)
Removal of lipids from human plasma low-density lipoprotein by detergents
Biochemistry 10, 2542-2547
- HEYWOOD, R., A.K. PALMER, R.L. GREGSON and H. HUMMLER (1985)
The toxicity of beta-carotene
Toxicology 36, 91-100
- HOLLANDER, D. and P.E. RUBLE, JR. (1978)
 β -carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport
Am. J. Physiol. 235, E686-E691
- INABA, T., A. INOUE, R. SHIMIZU, Y. NAKANO and J. MORI (1986)
Plasma concentrations of progesterone, estrogens, vitamin A and β -carotene in cows retaining fetal membranes
Jpn. J. Vet. Sci. 48, 505-508
- JONAS, A. (1979)
Interaction of bovine serum high density lipoprotein with mixed vesicles of phosphatidylcholine and cholesterol
J. Lipid Res. 20, 817-824
- KOVANEN, P.T., J.R. FAUST, M.S. BROWN and J.L. GOLDSTEIN (1979a)
Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells
Endocrinology 104, 599-609
- KOVANEN, P.T., S.K. BASU, J.L. GOLDSTEIN and M.S. BROWN (1979b)
II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue
Endocrinology 104, 610-616

- KRIEGER, M. (1987)
Reconstitution of the hydrophobic core of low-density lipoprotein
Methods Enzymol. 128, 608-613
- KRIEGER, M., M.S. BROWN, J.R. FAUST and J.L. GOLDSTEIN (1978)
Replacement of endogenous cholesteryl esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate
J. Biol. Chem. 253, 4093-4101
- KRIEGER, M., M.J. McPAUL, J.L. GOLDSTEIN and M.S. BROWN (1979)
Replacement of neutral lipids of low density lipoprotein with esters of long chain unsaturated fatty acids
J. Biol. Chem. 254, 3845-3853
- KRINSKY, N.I., D.G. CORNWELL and J.L. ONCLEY (1958)
The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma
Archs Biochem. Biophys. 73, 233-246
- KRINSKY, N.I. and S.M. DENEKE (1982)
Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids
J. Natl. Cancer Inst. 69, 205-210
- KUNKEL, H.G. and A.G. BEARN (1954)
Phospholipid studies of different serum lipoproteins employing p32
Proc. Soc. Exper. Biol. 86, 887-891
- LAURELL, C.B. (1965)
Antigen antibody crossed electrophoresis
Anal. Biochem. 10, 358-361
- LOTAN, R. (1980)
Effect of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells
Biochim. Biophys. Acta 605, 33-91
- LOTTHAMMER, K.-H. (1978)
Zur Bedeutung des β -Carotins für die Fruchtbarkeit des Milchrindes
Tierzüchter 12, 520-529
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951)
Protein measurements with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- LUNDBERG, B. (1987)
Preparation of drug-low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway
Cancer Res. 47, 4105-4108

- LUNDBERG, B. and L. SUOMINEN (1984)
Preparation of biologically active analogs of serum
low density lipoprotein
J. Lipid Res. 25, 550-558
- MAHLEY, R.W., T.L. INNERARITY, R.E. PITAS, K.H. WEISGRABER,
J. H. BROWN and E. GROSS (1977)
Inhibition of lipoprotein binding to cell surface recep-
tors of fibroblasts following selective modification of
arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins
J. Biol. Chem. 252, 7279-7287
- MARCEK, J.M., L.H. APPELL, C.C. HOFFMAN, P.T. MOREDICK and
L.V. SWANSON (1985)
Effect of supplemental β -carotene on incidence and
responsiveness of ovarian cysts to hormone treatment
J. Dairy Sci. 68, 71-77
- MATHEWS-ROTH, M.M. (1982)
Antitumor activity of β -carotene, canthaxanthin and
phytoene
Oncology 39, 33-37
- MATHEWS-ROTH, M.M. and N.I. KRINSKY (1984)
Effect of dietary fat level on UV-B induced skin tumors,
and anti-tumor action of β -carotene
Photochem. Photobiol. 40, 671-673
- MEINECKE, B., W. BITTNER and H. GIPS (1986)
The effect of β -carotene on fertility in cows: clinical
and endocrinological findings
Zuchthyg. 21, 225-232
- MODAN, B., H. CUCKLE and F. LUBIN (1981)
A note on the role of dietary retinol and carotene in
human gastro-intestinal cancer
Int. J. Cancer 28, 421-424
- NOBLE, R.P. (1968)
Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in
agarose gel
J. Lipid Res. 9, 693-700
- NORUM, K.R., T. BERG, P. HELGERUD and C.A. DREVON (1983)
Transport of cholesterol
Physiol. Rev. 63, 1343-1419
- ONCLEY, J.L., F.R.N. GURD and M. MELIN (1950)
Preparation and properties of serum and plasma proteins.
XXV. Composition and properties of human serum
 β -lipoprotein
J. Am. Chem. Soc. 72, 458-464

- PACKER, J.E., J.S. MAHOOD, V.O. MORA-ARELLANO, T.F. SLATER, R.L. WILLSON and B.S. WOLFENDEN (1981)
Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with β -carotene, diphenyl furan and 1,4,-diazobicyclo(2,2,2)-octane.
Biochem. Biophys. Res. Com. 98, 901-906
- PATTNAIK, N.M., A. MONTES, L.B. HUGHES and D.B. ZILVERSMIT (1978)
Cholesteryl ester exchange protein in human plasma.
Isolation and characterization
Biochim. Biophysic. Acta 530, 428-438
- PETO, R., R. DOLL, J.D. BUCKLEY and M.B. SPORN (1981)
Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?
Nature 290, 201-208
- PUPPIONE, D.L. (1978)
Implications of unique features of blood lipid.
Transport in lactating cow
J. Dairy Sci. 61, 651-659
- PUPPIONE, D.L., B. RAPHAEL, R.D. MCCARTHY and P.S. DIMICK (1972)
Variations in the electrophoretic distribution of low density lipoproteins of Holstein cows
J. Dairy Sci. 55, 265-268
- RADDING, C.M. and D. STEINBERG (1960)
Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices
J. Clin. Invest. 39, 1560-1569
- RAPHAEL, B.C., P.S. DIMICK and D.L. PUPPIONE (1973a)
Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation
J. Dairy Sci. 56, 1025-1032
- RAPHAEL, B.C., P.S. DIMICK and D.L. PUPPIONE (1973b)
Electrophoretic characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation
J. Dairy Sci. 56, 1411-1414
- RETTURA, G., F. STRATFORD, S.M. LEVENSON and E. SEIFTER (1982)
Prophylactic and therapeutic actions of supplemental β -carotene in mice inoculated with C3HBA adenocarcinoma cells: lack of therapeutic action of supplemental ascorbic acid
J. Natl. Cancer Inst. 69, 73-77
- RHODES, J. (1983)
Human interferon action: reciprocal regulation by retinoic acid and β -carotene
J. Natl. Cancer Inst. 70, 833-837

- RITTER, M.C. and A.M. SCANU (1977)
Role of apolipoprotein A-I in the structure of human serum high density lipoproteins
J. Biol. Chem. 252, 1208-1216
- RITTER, M.C. and A.M. SCANU (1979)
Apolipoprotein A-II and structure of human serum high density lipoproteins
J. Biol. Chem. 254, 2517-2525
- SANTAMARIA, L., A. BIANCHI, A. ARNABOLDI and L. ANDREONI (1980)
Prevention of the benzo(a)pyrene photocarcinogenic effect by β -carotene and canthaxanthine. Preliminary study
Boll. Chim. Farm. 119, 745-748
- SATO, J., H. SHIMASAKI and I. HARA (1971)
Properties of ultrasonically irradiated human serum lipoproteins
Lipids 7, 404-408
- SCANU, A., E. CUMP, J. TOTH, S. KOGA, E. STILLER and L. ALBERS (1970)
Degradation and reassembly of a human serum high-density lipoprotein. Evidence for differences in lipid affinity among three classes of polypeptide chains
Biochemistry 9, 1327-1335
- SCHNEIDER, H., R.S. MORROD, J.R. COLVIN and N.H. TATTRIE (1973)
The lipid core model of lipoproteins
Chem. Phys. Lipids 10, 328-353
- SCHWEIGERT, F.J., A. LUTTERBACH, W.A. RAMBECK and H. ZUCKER (1986)
Vitamin A- and β -carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size
J. Vet. Med. A 33, 360-364
- SCHWEIGERT, F.J., W.A. RAMBECK and H. ZUCKER (1987)
Transport of β -carotene by the serum lipoproteins in cattle
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 57, 162-167
- SCHWEIGERT, F.J. and H. ZUCKER (1988a)
Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality
J. Reprod. Fert., in Druck
- SCHWEIGERT, F.J. and H. ZUCKER (1988b)
Transfer of β -carotene into colostrum in the cow
Int. J. Vit. Nutr. Res. 58, in Druck

- SEGREST, J.P., R.L. JACKSON, J.D. MORRISETT and A.M. GOTTO, Jr.
(1974)
A molecular theory of lipid-protein interactions in the
plasma lipoproteins
Febs. Letters 38, 247-253
- SEIFTER, E., G. RETTURA, J. PADAWER and S.M. LEVENSON (1982)
Moloney murine sarcoma virus tumors in CBA/J mice: chemo-
preventive and chemotherapeutic actions of supplemental
 β -carotene
J. Natl. Cancer Inst. 68, 835-840
- SEIFTER, E., G. RETTURA, J. PADAWER, F. STRATFORD, P. GOODWIN
and S.M. LEVENSON (1983)
Regression of C3HBA mouse tumor due to X-ray therapy
combined with supplemental β -carotene or vitamin A
J. Natl. Cancer Inst. 71, 409-417
- SEIFTER, E., G. RETTURA, J. PADAWER, F. STRATFORD, J. WEINZWEIG,
A.A. DEMETRIOU and S.M. LEVENSON (1984)
Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin
A or β -carotene in CBA mice given total-body γ radiation
J. Natl. Cancer Inst. 73, 1167-1177
- SHEKELLE, R.B., S. LIU, W.J. RAYNOR, Jr., M. LEPPER, C. MALAZIA,
A.H. ROSOFF, O. PAUL, A.M. SHRYOCK and J. STAMLER (1981)
Dietary vitamin A and risk of cancer in the western
electric study
Lancet 2, 1185-1190
- SHEN, R.N., J. MENDECKI, G. RETTURA and E. SEIFTER (1983)
Partial prevention of radiation toxicity by supplemental
vitamin A (VA) and β -carotene (BC)
Fed. Proc. 42, 1124
- SKLAN, D. (1983)
Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle
Int. J. Vit. Nutr. Res. 53, 23-26
- SODHI, H.S. and R.G. GOULD (1967)
Combination of delipidized high density lipoprotein with
lipids
J. Biol. Chem. 242, 1205-1210
- SOM, S., M. CHATTERJEE and M.R. BANERJEE (1984)
 β -carotene inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-
induced transformation of murine mammary cells in vitro
Carcinogenesis 5, 937-940

- STEAD, D., M. TAMIR and V.A. WELCH (1978)
Interrelationship between apoproteins of very low density lipoprotein and other serum lipoproteins in lactating goats
J. Dairy Sci. 61, 1529-1536
- STEAD, D. and V.A. WELCH (1975)
Lipid composition of bovine serum lipoproteins
J. Dairy Sci. 58, 122-127
- STEELE, J.C.H., Jr. and J.A. REYNOLDS (1979)
Characterization of the apolipoprotein B polypeptide of human plasma low density lipoprotein in detergent and denaturant solutions
J. Biol. Chem. 254, 1633-1638
- STORRY, J.E., P.E. BRUMBY, B. TUCKLEY, V.A. WELCH, D. STEAD and R.J. FULFORD (1980)
Effect of feeding protected lipid to dairy cows in early lactation on the composition of blood lipoproteins and secretion of fatty acids in milk
J. agric. Sci., Camb. 94, 503-516
- SWANEY, J.B. (1985)
Membrane cholesterol uptake by recombinant lipoproteins
Chem. Phys. Lipids 37, 317-327
- THELLMAN, C.A. and R.B. SHIREMAN (1985)
In vitro uptake of ^3H - α -tocopherol from low density lipoprotein by cultured human fibroblasts
J. Nutr. 115, 1673-1679
- THOMAS, M.S. and L.L. RUDEL (1983)
 ^3H Cholesteryl ester labeling and transfer among human and nonhuman primate plasma lipoproteins
Anal. Biochem. 130, 215-222
- TRABER, M.G. and H.J. KAYDEN (1984)
Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low-density lipoprotein
Am. J. Clin. Nutr. 40, 747-751
- VELDHUIS, J.D., J.T. GWYNNE, P. AZIMI, J. GARMEY and D. JUCHTER (1985)
Properties of low density lipoprotein binding by cultured swine granulosa cells
Endocrinology 117, 1067-1074
- VUILLEUMIER, J.-P., H.E. KELLER, D. GYSEL and F. HUNZIKER (1983)
Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations
Int. J. Vit. Nutr. Res. 53, 265-272

- WALL, N.J., J. BOREHAM, J.L. HAYWARD and R.D. BULBROOK (1984)
Plasma retinol, β -carotene and vitamin E levels in
relation to the future risk of breast cancer
Br. J. Cancer 49, 321-324
- WALSH, M.T. and D. ATKINSON (1983)
Solubilization of low-density lipoprotein with sodium
deoxycholate and recombination of apoprotein B with
dimyristylphosphatidylcholine
Biochemistry 22, 3170-3178
- WATT, R.M. and J.A. REYNOLDS (1981)
Interaction of apolipoprotein B from human serum low-
density lipoprotein with egg yolk phosphatidylcholine
Biochemistry 20, 3897-3901
- ZILVERSMIT, D.B., L.B. HUGHES and J. BALMER (1975)
Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein-
free rabbit plasma
Biochim. Biophys. Acta 409, 393-398
- ZÖLLNER, N., W. GRÖBNER, C. BERGER und G. WOLFRAM (1969)
Elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine in
Agarosegel mit Albuminzusatz
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 7, 525-529
- ZUCKER, H., O. KREUTZBERG, W. HOLLWICH, D. MATZKE, J. KÖGEL und
G. BURGSTALLER (1980)
Untersuchungen zur Versorgung von Milchkühen mit β -Carotin
und Vitamin A. 2. Mitteilung: Einfluß auf Konzentration
in der Milch sowie klinisch-gynäkologische und hormon-
analytische Befunde
Zbl. Vet. Med. A 27, 525-533

LEBENS LAUF

Stephan Josef Geldner	geb. am 25. August 1961 in Schönbrunn/Staffelstein
Eltern	Ferdinand Geldner, tech. Angestellter und Marianne Geldner, geb. Hellmuth
Schulbildung	1967 - 71 Grundschule in Grundfeld 1971 - 80 Meranier-Gymnasium Lichtenfels
Abitur	27. Juni 1980
Studium	1980 - 85 an der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München
Staatsexamen	27. November 1985
Approbation	20. Januar 1986
Berufstätigkeit	September 1986 - Februar 1987 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physio- logische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tiermedizinischen Fakultät München

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Zucker, möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. F.J. Schweigert bedanke ich mich für die Einführung in das Gebiet der Carotinoide und die stetige Hilfsbereitschaft, sowie für zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W.A. Rambeck danke ich dafür, daß er als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Mein weiterer Dank gilt den Kollegen und Mitarbeitern des Labors für die jederzeit gewährte, freundliche Hilfe bei der Probennahme und der technischen Durchführung der Versuche, allen voran Frau Antje Wetzel.

Herrn Prof. Dr. J. Meyer und seinen Mitarbeitern vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim, sowie Herrn Dr. W. Hollwich in Grub danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Probennahme.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Dr. I. Schraner für die erwiesene Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Elektrophoresen und bei Frau B. Ammann für die Einführung im Umgang mit radioaktiven Material.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. T. Krieg und seinen Mitarbeitern von der Medizinischen Fakultät der Universität München für die Bereitstellung der Laborräume und die Überlassung der Zellkulturen.

